

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Martina Bartošová

Efekt sulfidu sodného na vlastnosti modelových hemových
senzorových proteinů s globinovou strukturou senzorové domény

Effect of sodium sulfide on the properties of model globine-coupled heme-
containing sensor proteins

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2014

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi při vypracování této diplomové práce věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Stráňavovi za cenné rady, připomínky a všestrannou pomoc s experimentální částí práce.

Také děkuji svým rodičům Aleně a Michalovi Bartošovým za péči a podporu během celého studia.

Abstrakt

Sulfan se účastní různých fyziologických procesů a je přiřazován k signálním molekulám podobně jako oxid uhelnatý nebo oxid dusnatý. Cílem působení H_2S mohou být například proteiny, enzymy, transkripční faktory nebo iontové kanály. V mnoha případech je efekt H_2S způsoben modifikací klíčových zbytků cysteinu ve struktuře regulačních proteinů. V případě hemoproteinů může H_2S regulovat tyto proteiny navíc také prostřednictvím interakce s iontem železa hemu za vzniku $Fe(III)$ -SH komplexu nebo redukcí iontu železa s následnou formací $Fe(II)$ - O_2 komplexu.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem Na_2S na modelové senzorné hemové proteiny s globinovou strukturou senzorné domény. Prvním studovaným proteinem je protein izolovaný z bakterie *Anaeromyxobacter* sp. kmen FW109-5 s histidinkinasovou aktivitou a globinovou strukturou senzorné domény (*AfGcHK*), druhým studovaným proteinem je protein izolovaný z bakterie *Escherichia coli* s diguanylátcyklasovou aktivitou a globinovou strukturou senzorné domény (*YddV*). UV-Vis spektrální analýzou byl prokázán vliv Na_2S na oba modelové proteiny a jejich mutanty. Zvláště spektra *YddV*-HD Y43A v přítomnosti Na_2S jsou unikátní, protože potvrzují vznik homogenního a příměsí prostého komplexu $Fe(III)$ -SH v daném proteinu, zatímco u ostatních proteinů jsou zaznamenány pouze směsi různých komplexů hemu. Dále byl zkoumán vliv Na_2S na aktivitu funkční domény modelového proteinu *AfGcHK* pomocí elektrofórické s činidlem phos-tag. Byl pozorován nárůst v autofosforylační aktivitě proteinu až o 40%. Navýšení autofosforylační aktivity je v případě tohoto proteinu pravděpodobně způsobené tvorbou $Fe(III)$ -SH komplexu. Dalším zajímavým poznatkem je, že na aktivaci autokinasové aktivity vlivem Na_2S má pozitivní vliv přítomnost proteinu regulujícího odpověď dané histidinkinasy. Na závěr jsme potvrdili, že interakce Na_2S s hemem je klíčová pro stimulaci autofosforylační reakce *AfGcHK*. Navíc se zdá, že přítomnost hemu v senzorné doméně je velmi důležitá i pro autokinasovou reakci *AfGcHK* bez účasti Na_2S .

Klíčová slova: senzorné proteiny detekující kyslík, hem, sulfid sodný, histidinkinasa, diguanylátcyklasa

Abstract

Hydrogen sulfide mediates various physiological functions and along with carbon monoxide and nitric oxide it is an important gaseous signaling molecule. Cellular targets for H₂S are proteins, enzymes, transcriptional factors or ion channels. In many cases, the effect of H₂S on the regulatory protein is mediated by modifications of its cystein residues. In hemoproteins, the regulation of catalytic activity is induced by formation of the Fe(III)-SH complex or by reduction of the heme iron with subsequent formation of Fe(II)-O₂ complex.

The effect of Na₂S on model sensor heme-containing proteins is presented in this thesis. Protein, isolated from bacterium *Anaeromyxobacter* sp. strain FW109-5, containing a globine coupled sensor domain and a histidine kinase domain is one of the studied proteins, the second one is protein isolated from bacterium *Escherichie coli*, containing a globine coupled sensor domain and a diguanylate cyclase domain. The effect of Na₂S on both model proteins and their mutants was studied by UV-Vis spectral analysis. Spectra of YddV-HD Y43A were very unique, because they confirmed formation of a homogenous complex Fe(III)-SH in this protein, whereas only mixtures of varous heme complexes were detected in other tested proteins. Additionally the effect of Na₂S on functional domain of model protein *AjGCHK* was tested using the phos-tag electrophoresis. An increase by 40% in autophosphorylation activity of *AjGCHK* influenced by Na₂S was detected. This increase in enzyme activity was caused by Fe(III)-SH complex formation. Interestingly, the presence of a response regulatory protein had a positive effect on activation of autophosphorylation activity by Na₂S. It was found that an interaction of Na₂S with heme could be crucial for the enzyme activity stimulation. Additionally we suggested that heme localized in the sensor domain of the protein is important for autophosphorylation activity of *AjGCHK*.

Key words: oxygen sensor proteins, heme, hydrogen sulfide, histidine kinase, diguanylate cyclase

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam zkratek | 4 |
| 1. Úvod..... | 8 |
| 1.1. Hemoproteiny..... | 8 |
| 1.2. Hemové senzorové proteiny..... | 9 |
| 1.2.1. Hemové senzorové proteiny detekující hem..... | 10 |
| 1.2.2. Hemové senzorové proteiny detekující plynné molekuly..... | 11 |
| 1.2.2.1. Hemové senzorové proteiny detekující kyslík..... | 12 |
| 1.2.2.1.1. PAS doména..... | 13 |
| 1.2.2.1.2. GAF doména | 13 |
| 1.2.2.1.3. Globinová doména | 14 |
| 1.2.2.1.4. Histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény izolovaná z bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. kmen FW 109-5 (<i>AfGcHK</i>)..... | 14 |
| 1.2.2.1.5. Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény (YddV) | 15 |
| 1.3. Plyny jako signální molekuly..... | 16 |
| 1.3.1. NO..... | 16 |
| 1.3.2. CO..... | 17 |
| 1.3.3. H ₂ S | 19 |
| 1.3.4. O ₂ | 22 |
| 1.4. Vliv Na ₂ S na hemové senzorové proteiny | 23 |
| 2. Cíl práce | 26 |

| | |
|--|----|
| 3. Materiál a metody | 27 |
| 3.1. Použité přístroje | 27 |
| 3.2. Použité chemikálie | 28 |
| 3.3. Použité metody..... | 30 |
| 3.3.1. Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)..... | 30 |
| 3.3.2. Exprese proteinů <i>AfGcHK</i> , <i>RR</i> a <i>YddV</i> | 31 |
| 3.3.3. Izolace proteinů <i>AfGcHK</i> , <i>RR</i> a <i>YddV</i> | 33 |
| 3.3.4. Příprava apoformy <i>AfGcHK</i> | 35 |
| 3.3.4.1. Příprava apoformy <i>AfGcHK</i> WT, <i>AfGcHK</i> L68F, <i>AfGcHK</i> Y45W a <i>AfGcHK</i> H99A vynecháním inkubace s heminem během izolace | 35 |
| 3.3.4.2. Ethylmethyketonová extrakce <i>AfGcHK</i> WT | 35 |
| 3.3.4.3. Příprava apoformy <i>AfGcHK</i> WT, <i>AfGcHK</i> L68F a <i>AfGcHK</i> Y45W heterologní expresí při 37°C po dobu 5 hodin..... | 36 |
| 3.3.5. SDS-PAGE | 36 |
| 3.3.5.1. Příprava vzorků pro SDS-PAGE | 37 |
| 3.3.6. Stanovení koncentrace proteinu..... | 38 |
| 3.3.7. Spektrální analýza vlivu Na ₂ S na charakteristická UV-Vis spektra modelových proteinů (<i>AfGcHK</i> a <i>YddV</i>) | 38 |
| 3.3.8. Studium enzymových aktivit modelových proteinů a měření vlivu Na ₂ S na tyto aktivity | 38 |
| 3.3.9. Phos-tag SDS-PAGE | 39 |
| 4. Výsledky | 41 |
| 4.1. Modelový senzorový hemový protein <i>YddV</i> | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.1.1. Změny UV-Vis spekter proteinu YddV-HD v jeho přirozené podobě i u mutantů způsobené přidavkem Na ₂ S | 42 |
| 4.2. Modelový senzorový hemový protein AfGcHK..... | 50 |
| 4.2.1. Změny UV-Vis spekter proteinu AfGcHK způsobené přidavkem Na ₂ S | 50 |
| 4.2.2. Změna enzymové aktivity proteinu AfGcHK v jeho přirozené formě i u mutantů způsobená přidavkem Na ₂ S | 59 |
| 4.2.2.1. Porovnání vlivu Na ₂ S na enzymové aktivity AfGcHK WT a jeho mutantů | 73 |
| 4.2.3. Vliv Na ₂ S na enzymové aktivity částečných apoforem AfGcHK WT, AfGcHK L68F a AfGcHK Y45W | 76 |
| 4.2.4. Vliv Na ₂ S na enzymovou aktivitu AfGcHK H99A..... | 83 |
| 5. Diskuse..... | 86 |
| 6. Závěr | 94 |
| 7. Seznam použité literatury | 95 |

Seznam zkratek

Názvy některých v práci uvedených proteinů a struktur nejsou v pravém slova smyslu zkratkou. Spíše se jedná o akronym nebo krátký triviální název. Přesto jsou v tomto seznamu zkratek uvedeny pro snazší orientaci v textu.

| | |
|----------|---|
| 3-MST | 3-merkaptopyruvát sulfotransferasa |
| AjGcHK | Histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény izolovaná z bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. kmen FW109-5, z angl. „ <i>A</i> <u>n</u> <i>aeromyxobacter</i> sp. strain <u>F</u> W109-5 <u>g</u> lobin <u>c</u> oupled <u>h</u> istidin <u>k</u> inase“ |
| APS | persíran amonný, z angl. „ <u>a</u> mmonium <u>p</u> ersulfate“ |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BCA | 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina |
| BIS | N,N'-methylen-bisakrylamid |
| c-di-GMP | cyklický bis-(3',5')-diguanosinmonofosfát |
| CBS | cystathionin β -syntasa |
| CcO | cytochrom c oxidasa |
| cGMP | 3',5'-cyklický guanosinmonofosfát |
| CooA | CO-oxidační aktivátor |
| CSE | cystathionin γ -lyasa |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina, z angl. „ <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“ |
| DosR | transkripční faktor, jehož aktivací dojde ke spuštění exprese genů kódujících proteiny, které se účastní anaerobní respirace a metabolismu organismu |

| | |
|----------------|---|
| DosS | přímý kyslíkový senzor s GAF doménou na N-konci a histidin kinasovou doménou na C-konci, s DosR tvoří dvoukomponentní systém regulující transkripci |
| DosT | přímý kyslíkový senzor s GAF doménou na N-konci a histidin kinasovou doménou na C-konci, s DosR tvoří dvoukomponentní systém regulující transkripci |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| eIF2 α | eukaryotní iniciační faktor 2 α |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| fixJ | gen kódující protein FixJ |
| FixJ | přirozený substrát pro FixL; transkripční faktor regulující expresi genů, které kódují proteiny zodpovědné za fixaci vzdušného dusíku |
| fixL | gen kódující protein FixL |
| FixL | protein obsahující funkční doménu s kinasovou aktivitou schopný detekce kyslíku; s FixJ tvoří dvoukomponentní systém regulující expresi genu na úrovni transkripce |
| FPLC | rychlá proteinová kapalinová chromatografie, z angl. „ <u>f</u> ast <u>p</u> rotein <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography“ |
| GTP | guanosintrifosfát |
| GAF | specifické prostorové uspořádání terciární struktury proteinů; název domény byl odvozen z anglických názvů proteinů, ve kterých se tato doména vyskytuje: „c <u>G</u> MP-specific fosfodiesterases“, „a <u>d</u> enylyl cyclases“ a „f <u>o</u> rmate hydrogen lyase transcription activator“ |
| H-NOX | doména vážící oxid dusnatý a kyslík, z angl. „ <u>h</u> eme- <u>n</u> itric oxide and <u>o</u> xygen binding family“ |

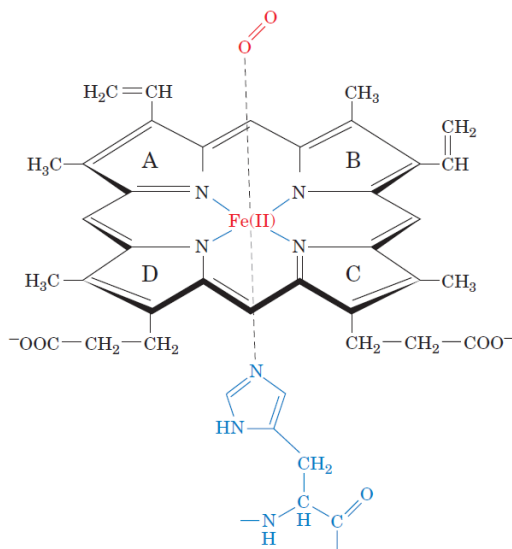
| | |
|------------|--|
| HemAT | aerotaxní transduktor obsahující hem jako prostetickou skupinu |
| IPTG | isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid |
| LB medium | Luria Broth medium |
| M | mol/dm ³ |
| MAPK | mitogenem aktivované proteinkinasy, z angl „ <u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase“ |
| NOS | NO syntasa |
| P-AfGcGK | fosforylovaná histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény (H183) |
| P-P-RR | dvojitě fosforylovaný regulátor odpovědi (D52 a D169) |
| P-RR | fosforylovaný regulátor odpovědi (D52) |
| PAS | specifické prostorové uspořádání terciární struktury proteinů; název domény byl odvozen z anglických názvů proteinů, ve kterých se tato doména vyskytuje: „ <u>p</u> eriod clock protein“, „ <u>a</u> ryl hydrocarbon receptor“ a „ <u>s</u> ingle-minded protein“ |
| Phos-tag | 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinečnatý komplex |
| PMSF | fenylmethansulfonyl fluorid |
| ROS | reaktivní formy kyslíku, z angl „ <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies“ |
| RPM | otáčky za minuty, z angl „ <u>r</u> evolution per <u>m</u> inute“ |
| RR protein | regulátor odpovědi, přirozený substrát pro AfGcHK, z angl. „ <u>r</u> esponse <u>r</u> egulator protein“ |
| SDS | dodecylsulfát sodný, z angl „ <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate“ |

| | |
|-----------|---|
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného, z angl „ <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis“ |
| sGC | solubilní guanylátcyklasa |
| TB medium | Terrific Broth medium |
| TEMED | N,N,N'N'-tetramethylethylendiimin |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| v/v | objem/objem, z angl „ <u>v</u> olume/ <u>v</u> olume“ |
| w/v | hmotnost/objem, z angl „ <u>w</u> eight/ <u>v</u> olume“ |
| WT | protein bez mutace, z angl. „ <u>w</u> ild <u>t</u> ype“ |
| YddV | diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény; název proteinu je odvozen od názvu genu yddV |
| YddV-HD | hemová doména diguanylátcyklasy s globinovou strukturou senzorové domény |
| λ | vlnová délka |

1. Úvod

1.1. Hemoproteiny

Hemoglobin, krevní barvivo, nebo cytochrom P540, protein účastnící se metabolismu cizorodých látek, jsou známé a důležité proteiny. Oba tyto proteiny patří do skupiny hemoproteinů, protože obsahují hem jako prostetickou skupinu. Hem je tvořen iontem železa a systémem heterocyklických kruhů, který je nazývaný protoporfyrin IX. Protoporfyrin IX je derivátem porfínu, který se skládá ze 4 pyrolových jader spojených methinovými můstky, se 4 methylovými, 2 vinylovými a 2 propionovými substituenty [1]. Ion železa je v porfyrinu vázán ke čtyřem dusíkům, které jsou poskytovány jednotlivými pyrolovými jádry [2]. V hemoproteinech je železo penta- až hexa-koordinované. Pátým ligandem bývá aminokyselinový zbytek, nejčastěji histidinu nebo cysteinu [3]. Šestým ligandem navázaným proti aminokyselinovému zbytku bývá malá molekula jako O_2 , CO, NO, CN^- (viz obrázek 1) [1]. Šestým ligandem ale může být i další aminokyselinový zbytek jako je tomu například u deoxyhemoglobinu, který má jako pátý a šestý ligand proximální a distální histidin [4].



Obrázek 1: **Molekula hemu v oxyhemoglobinu.** Hexakoordinované železo má kromě 4 vazeb s dusíky pyrolových jader ještě dva další ligandy nad a pod planární rovinou. Jedná se o dusík imidazolového kruhu histidinu zapojeného do globinové struktury proteinu a o molekulu kyslíku. Převzato z citace [1].

V současné době je známo mnoho různých hemoproteinů. Tuto velkou skupinu proteinů lze dělit podle jejich funkce v organismu do čtyř základních skupin. Pro proteiny patřící do první skupiny hemoproteinů je typická schopnost transportu a skladování plyných molekul. Typickým příkladem je hemoglobin, který zabezpečuje transport molekuly kyslíku, nebo myoglobin nezbytný pro uskladnění kyslíku v buňce. Tyto proteiny mohou mít různé ligandy včetně CO, NO a H₂S. Reverzibilita vazby mezi plyným ligandem a hemem umožňuje jak rychlou vazbu, tak rychlou disociaci v okamžiku potřeby nebo kompetice s jiným ligandem [5]. Pro proteiny patřící do druhé skupiny hemoproteinů je typická schopnost transferu elektronů. Příkladem proteinu zajišťujícího tuto funkci je cytochrom b₅ nebo cytochrom c v mitochondriích. Cytochrom c přenáší elektrony mezi membránovými komplexy dýchacího řetězce eukaryot. Přenos elektronů je zajištěn změnou mezi dvěma oxidačními stavy železa v hemu [5,6]. Pro proteiny nacházející se ve třetí skupině hemoproteinů je typická schopnost katalýzy redukčně-oxidačních reakcí. Příkladem takového proteinu může být hemoxygenasa - enzym produkující CO (viz kapitola 1.3.2., str. 18) a NO syntasa (NOS) - enzym produkující NO (viz kapitola 1.3.1., str. 16). Důležitými členy této skupiny jsou také cytochrom c oxidasa (CcO) a cytochrom P450 [7]. Proteiny patřící do čtvrté skupiny hemoproteinů fungují jako senzory a jsou schopné detekce plyných molekul. V těchto proteinech není molekula hemu umístěna ve funkční části proteinu, ale nachází se v regulačním místě. Tam se na ni váže molekula plynu a dojde ke spuštění různých fyziologických procesů. Mezi tyto detekční proteiny patří například cystathionin β-syntasa (CBS) nebo solubilní guanylylcyklasa (sGC) [5]. Více je o těchto proteinech napsáno v kapitole 1.2.

1.2. Hemové senzorové proteiny

Senzorové proteiny umožňují buňce odpovědět na environmentální impulsy jako světlo, hypoxie nebo přítomnost speciální signální molekuly [8]. Tyto proteiny se skládají z minimálně dvou domén, senzorové a funkční. Impulem aktivovaná senzorová doména změní svou konformaci. Konformační změna vede k modifikaci ve struktuře a aktivitě funkční domény [8]. Velmi důležité jsou senzorové proteiny, které mají jako kofaktor

molekulu hemu pevně vázanou v senzorové doméně proteinu. Tato hemová senzorová doména je pak vlastním detekčním místem, na které se mohou vázat ligandy jako např. malé plynné molekuly (O_2 , CO, NO a H_2S). Takovýto proces pak umožní detekci těchto plynných molekul [8].

1.2.1. Hemové senzorové proteiny detekující hem

Proteiny, které detekují přímo koncentraci hemu a podle toho pak aktivují či deaktivují funkční doménu, se nazývají hemové senzorové proteiny detekující hem. Mezi tyto proteiny patří hemem regulovaný inhibitor (HRI) nebo neuronální PAS protein 2 [9]. Neuronální PAS protein 2 reguluje cirkadiální rytmy na úrovni transkripce [10].

HRI je hemoprotein se senzorovou doménou na N-konci a funkční doménou na C-konci, která vykazuje kinasovou enzymovou aktivitu (označovaná též jako kinasová doména). Hem se v případě HRI váže na zbytek aminokyseliny histidin v senzorové doméně a zároveň na thiolátovou skupinu cysteinu v kinasové doméně [11].

Pokud se buňka nachází v krizovém stavu způsobeném například nedostatkem živin, akumulací denaturovaných proteinů nebo virovou infekcí dojde k terminaci translace. Regulace translace pomocí HRI přichází na řadu také v případě buněčného stresu vyvolaného nedostatkem hemu, protože i za neoptimálních podmínek je třeba regulovat poměr mezi množstvím hemu a množstvím proteinových globinových řetězců [12]. HRI reguluje syntézu globinu v prekurzorech červených krvinek, tzv. retikulocytech. Vyskytuje se ale i v jiných tkáních jako jsou játra a ledviny, kde se rovněž může zapojit do procesu regulace proteosyntézy [13]. HRI patří do rodiny kinas eukaryotního iniciačního faktoru 2α (eIF2 α), který reguluje iniciaci translace. Za normálních podmínek je hem navázaný na HRI, čímž ho deaktivuje, kinasová reakce vůči eIF2 α není realizována a proteosyntéza může probíhat. V případě nedostatku hemu však dojde k disociaci hemu a aktivaci HRI. HRI fosforyluje alfa podjednotku eIF2 α , ta se pevně naváže na eukaryotní iniciační faktor 2B, čímž znemožní výměnu guanosinového nukleotidu (guanosindifosfát za guanosintrifosfát, GTP) a ukončuje tak proteosyntézu [11].

1.2.2. Hemové senzorové proteiny detekující plynné molekuly

Větší skupinu hemových senzorových proteinů tvoří hemoproteiny detekující plyn. Tyto proteiny mají v buňce nezastupitelnou roli, zajišťují regulaci transkripce specifických genů, iniciaci signalizačních kaskád a další biochemické děje [14]. Proteiny detekující plyn jsou aktivovány nebo deaktivovány na základě přítomnosti určité signální molekuly. Dosud jsou známy proteiny detekující kyslík, oxid dusnatý a oxid uhelnatý. Zatím nebyl nalezen specifický senzor pro sulfan.

Jak tyto proteiny fungují? Princip je velmi podobný jako u senzorových proteinů detekujících hem. I v těchto proteinech se nacházejí minimálně dvě domény – senzorová a funkční doména. Na rozdíl od proteinů detekujících hem je hem v proteinech detekujících plyn pevně vázán v senzorové doméně. Pokud je přítomna molekula plynu, naváže se na hem v senzorové doméně a senzorová doména pak změní své prostorové uspořádání. Takto je vyslán signál funkční doméně, která se aktivuje, popřípadě deaktivuje. Vyskytují se také proteiny, ve kterých k aktivaci/deaktivaci funkční domény dochází naopak po disociaci plynu z molekuly hemu [8].

Zástupcem senzorových proteinů schopných detekce oxidu uhelnatého je CO-oxidační aktivátor (CooA) [14]. CooA je homodimerní protein, který má hem jako svou prostetickou skupinu a reguluje expresi na úrovni transkripce [15]. Neaktivní CooA obsahuje hem s Fe(III) komplexem a cysteinem jako axiálním ligandem. Dochází-li k redukci železitého iontu na železnatý je thiolátový zbytek cysteinu nahrazen imidazolovým zbytkem histidinu a na Fe(II) se váže CO [16]. Tyto změny v senzorové doméně vyvolají prostorové změny ve funkční doméně a umožní tak interakci funkční domény se specifickým úsekem deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. „deoxyribonucleic acid“) a následnou transkripci potřebných genů [14, 17]. Vazba CO na tento protein umožňuje transkripci genů kódující proteiny, které jsou důležité pro oxidaci CO na CO₂ [18]. NO se také váže na hem v CooA, ale na rozdíl od CO neumožňuje interakci funkční domény s DNA [16].

Typickým proteinem detekujícím NO je sGC. NO se váže na sGC, čímž ji aktivuje a zajišťuje tak produkci cyklického 3',5'-guanosinmonofosfátu (cGMP), který slouží jako druhý posel v buňkách a spouští různé fyziologické odpovědi v mnoha tkáních. Tato

guanylátcyklasa odpovídá už na nanomolární koncentrace NO a katalyzuje přeměnu GTP na cGMP a pyrofosfát. cGMP pak ovlivňuje proteiny jako cGMP dependentní kinasy, cGMP regulované iontové kanály a různé fosfodiesterasy [19].

sGC obsahuje několik domén, za detekci NO je odpovědná doména vážící oxid dusnatý a kyslík (H-NOX, z angl. „heme-nitric oxide/oxxygen binding“). Tato H-NOX doména se může vyskytovat i v jiných proteinech, kde váže kyslík a/nebo oxid dusnatý [20]. Aby mohla tato doména vázat kyslík, vyžaduje na proximální straně hemu donor vodíkové vazby. sGC ve své H-NOX doméně tento donor nemá a proto znemožňuje vazbu molekuly kyslíku k hemu. Tím je zajištěna specifická senzitivita vůči NO [19]. NO a CO jsou si velmi podobné. Může tedy dojít k navázání CO na sGC a vytvoření hexakoordinovaného iontu železa v hemu. Vazbou molekuly CO na sGC tedy dojde k částečné aktivaci sGC. Vazbou NO na iont železa v hemu se ovšem vytvoří pentakoordinovaný komplex NO s hemem, hem již tedy není koordinován k proteinu a dojde k plné aktivaci sGC [8].

1.2.2.1. Hemové senzorové proteiny detekující kyslík

Hemové senzorové proteiny detekující kyslík jsou pravděpodobně nejrozšířenějším typem hemových senzorových proteinů. Tyto senzory dále můžeme také rozdělit podle typu struktury jejich senzorové domény nebo podle katalytické aktivity funkční domény. Existují tři typy struktur senzorových domén kyslíkových senzorů, konkrétně PAS doména, GAF doména a doména s globinovou strukturou [17], které jsou blíže popsány v následujících podkapitolách. Funkční domény mohou vykazovat enzymovou aktivitu nebo mohou fungovat jako transkripční faktory. Jako enzymová aktivita funkčních domén hemových senzorových proteinů detekujících kyslík se nejčastěji uplatňuje kinasová aktivita nebo enzymová aktivita spojená se syntézou nebo degradací sekundárního posla, cGMP nebo cyklického bis-(3',5')-diguanosinmonofosfátu (c-di-GMP). Přímou nebo přes různé kaskády a biologické cesty tyto proteiny ovlivňují expresi specifických proteinů jako odpověď na externí podnět [8]. Pravděpodobně nejvíce prozkoumaným zástupcem této skupiny je dvoukomponentní regulační systém FixL/FixJ. Názvy proteinů jsou odvozeny od názvů genů fixL a fixJ. Tento systém zajišťuje aktivaci transkripce genů kódujících

proteiny důležité pro fixaci dusíku v prostředí s nedostatkem O₂ [21]. Indukce transkripce je zahájena, když koncentrace kyslíku klesne pod 50 μM [22].

1.2.2.1.1. PAS doména

Název domény PAS byl odvozen z označení tří proteinů, ve kterých se tento motiv vyskytuje. Jsou to: „period clock protein“, „aryl hydrocarbon receptor“ a „single-minded protein“ [23]. Tento motiv není specifický pouze pro hemové senzorové proteiny a byl nalezen u dalších 1300 signálních proteinů [24].

Proteinů s PAS doménou je celá řada. Mezi nejznámější patří již dříve zmíněný FixL/FixJ nebo přímý kyslíkový senzor z *Escherichie coli* (*E.coli*) (*Ec* DOS, z angl. „*E. coli* direct oxygen sensor“) vykazující diguanylátcyklasovou aktivitu funkční domény, kterému je věnována kapitola 1.4. (str. 23).

1.2.2.1.2. GAF doména

Název GAF domény byl odvozen z označení tří proteinů, ve kterých se tento motiv vyskytuje. Jsou to: „cGMP-specific fosfodiesterases“, „adenylyl cyclases“ a „formate hydrogen lyase transcription activator“ [25].

GAF doména je strukturně podobná PAS doméně [25]. Odhaduje se, že v dnešní době je kolem 1400 proteinů obsahujících právě GAF doménu. Tato doména bývá spojována s proteiny účastnící se regulace genové exprese v bakteriích, signálních drah rostlin a cyanobakterií, detekce světla a mnoha dalších buněčných pochodů [26].

Dvěma hlavními zástupci hemových senzorových proteinů s GAF strukturou senzorové domény jsou proteiny DosT a DosS. Oba tyto proteiny pocházejí z bakterie *Mycobacterium Tuberculosis*, kde regulují přechod mezi virulentním a latentním stavem [8]. DosT a DosS jsou autokinasy, které nejprve fosforylují histidin ve svých funkčních doménách a pak transportují fosfát na aspartát proteinu DosR [17]. DosR je přirozený substrát neboli regulátor odpovědi pro DosS a DosT [27]. DosT je senzor schopný detekce hypoxie zatímco DosS je senzor reagující na redoxní stres v buňce [28]. Senzorová doména DosT se skládá ze dvou GAF domén. GAF-A doména obsahuje hem a je tedy schopná interagovat s ligandy, jako jsou O₂, NO a CO. K inhibici kinasové aktivity ale

dochází pouze po navázání O₂ [29]. Doména GAF-B neobsahuje hem, takže není schopná vázat signální molekulu [3]. GAF-B interaguje s GAF-A pravděpodobně tak, že upravuje strukturu hemové kapsy proteinu [17]. Takto je zajištěna specifita proteinu vzhledem k vazbě kyslíku oproti interakci s NO a CO [30]. Za anaerobních podmínek O₂ disociuje z DosT, což způsobí přerušení určitých vodíkových vazeb v proteinu. To vyvolá konformační změny ve funkční doméně a dojde k aktivaci kinasové aktivity [31]. Fosforylovaný DosR je schopný aktivovat geny kódující proteiny, které se účastní anaerobní respirace a metabolismu [32].

1.2.2.1.3. Globinová doména

Prostorové uspořádání globinové domény sensorových proteinů je velmi podobné struktuře hemoglobinu či myoglobinu [33]. Jako první byla globinová doména nalezena u aerotaxního transduktoru obsahujícího hem (HemAT) [13]. HemAT je protein, který reguluje pohyb bakterie v rámci O₂ gradientu. Tento sensor tvoří homodimerní strukturu a obsahuje hem jako prostetickou skupinu v sensorové, globinové doméně. HemAT je schopný vázat jak O₂ tak CO nebo NO na hem ve své sensorové doméně. Jen vazba s kyslíkem ovšem umožňuje tvorbu vodíkových vazeb potřebných k vyvolání konformační změny a předání signálu funkční doméně [34]. Funkční doména je lokalizovaná na C-konci tohoto proteinu a je podobná doméně methyl akceptujícího chemotaxního proteinu, což je membránový protein přenášecí signál určující směr flagelárního motoru [35].

1.2.2.1.4. Histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény izolovaná z bakterie *Anaeromyxobacter* sp. kmen FW 109-5 (*AfGcHK*)

Dvoukomponentní systém převádějící signál se účastní mnoha různých odpovědí bakterie na environmentální podněty. Tyto systémy se skládají ze sensorové histidinkinasy a tak zvaného regulátoru odpovědi (RR protein, z angl „response regulator protein“) [36]. Již dříve byl zmíněn dvoukomponentní systém FixL/FixJ. Dalším příkladem je systém proteinů *AfGcHK/RR*.

AfGcHK se vyskytuje ve formě dimeru. Tento protein má na N-konci globinovou sensorovou doménu a na C-konci funkční doménu s histidinkinasovou aktivitou. Druhou složkou tohoto dvoukomponentního systému je regulátor odpovědi [36]. Studie provedené s mutanty *AfGcHK* dokazují, že axiálním ligandem hemu je histidin v pozici 99. Mutovaný

protein, ve kterém je histidin 99 nahrazen alaninem, nemá schopnost vázat hem, ale stále má autofosforylační aktivitu [36]. Tyto studie také ukazují, že histidin v pozici 183 je autofosforylačním místem AfGcHK [36]. Studie s mutanty také naznačují, že aspartáty v pozicích 52 a 169 jsou fosforylačními místy RR proteinu [36].

Vazbou kyslíku na hem dojde ke zvýšení autofosforylační aktivity. Kinasová doména jedné podjednotky proteinu fosforyluje histidin druhé podjednotky. Následně dochází k přenosu fosfátu na aspartát RR proteinu [33]. Přesná funkce RR proteinu zatím není známa. AfGcHK obsahující hemové komplexy Fe(III), Fe(II)-O₂ a Fe(II)-CO vykazuje katalytickou aktivitu, zatímco protein s Fe(II) komplexem je neaktivní [36].

1.2.2.1.5. Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény (YddV)

C-di-GMP je důležitým takzvaným druhým poslem v bakteriálních buňkách, který reguluje fyziologické funkce, jako jsou virulence, vývoj, buněčná komunikace nebo tvorba biofilmu [37]. Přísná regulace koncentrace c-di-GMP je nezbytná pro přežití buňky ve stresových podmínkách [38]. Syntéza a degradace c-di-GMP je iniciována různými signály jako je fosforylace nebo vazba iontů, DNA nebo molekuly plynu. Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény (YddV) se účastní produkce c-di-GMP. Geny yddV a dos (př. *Ec* Dos) jsou v *E. coli* v tandemu a právě produkty těchto genů regulují koncentraci c-di-GMP a udržují tak jeho homeostázu v bakteriích [38].

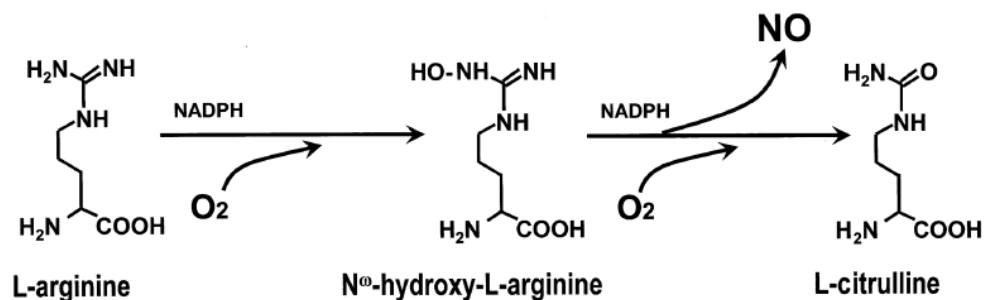
YddV je protein obsahující globinovou strukturu na N-konci a GGDEF doménu s diguanylátcyklasovou aktivitou na C-konci [38]. GGDEF má název odvozený od konzervované aminokyselinové sekvence typické pro tuto doménu [39]. V globinové doméně YddV se vyskytuje pentakoordinovaný hem. Pokusy provedené s mutanty YddV odhalily, že histidin v pozici 98 je axiálním ligandem hemu. Tyto pokusy také dokazují, že YddV bez navázaného hemu je stále aktivní [38]. Další studie provedené s mutanty YddV ukazují na důležitost tyrosinu 43 a leucinu 65. Tyto aminokyseliny přímo neváží kyslík, ale podílejí se na tvorbě optimálního prostředí pro vazbu kyslíku k hemu [40]. Proteiny obsahující hemové komplexy Fe(III), Fe(II)-O₂ a Fe(II)-CO vykazují katalytickou aktivitu, zatímco proteiny s Fe(II) a Fe(II)-NO komplexy jsou neaktivní [38].

1.3. Plyny jako signální molekuly

Oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sulfan se vyskytovaly na Zemi již v době, kdy v atmosféře nebyl ještě přítomen kyslík v míře, jakou známe dnes, a z části se účastnily na vzniku života a vývinu eukaryotických organismů [41]. Postupem času se začalo zvyšovat množství kyslíku v atmosféře, NO, CO a H₂S už nebyly tak využívány. Z metabolismu organismů nevymizely tyto molekuly úplně, ale byly využity k fyziologickým procesům, hlavně k signalizaci a její regulaci [41]. Molekuly plynů jako je oxid dusnatý, oxid uhelnatý nebo sulfan jsou toxiny a pro buňku jsou tedy škodlivé, v malém množství jsou ovšem nezbytné pro předání signálu a zajištění důležitých buněčných dějů [19]. Kyslík, jako produkt oxygenní fotosyntézy, je produkován pouze rostlinami a cyanobakteriemi, zatímco CO, NO a H₂S mohou vznikat přímo v buňkách enzymovými reakcemi [5]. Kyslík není signální molekulou v pravém slova smyslu, nicméně pro některé organismy je důležité rozlišit mezi anaerobním a aerobním prostředím a v tomto smyslu můžeme na O₂ pohlížet také jako na signální molekulu aerobního prostředí.

1.3.1. NO

Oxid dusnatý, diatomická molekula s poločasem života několik sekund [42], se v tkáních vyskytuje jen ve velmi malých koncentracích [19]. NO je syntetizován z L-argininu rodinou enzymů nazývanou NOS. NOS jsou hemoproteiny obsahující oxygenasovou a reduktasovou doménu [5]. Schéma vzniku NO je zobrazeno na obrázku 2 (str. 17). V buňkách je mnoho izoform NOS: neuronální, endoteliální a inducibilní. Neuronální a endoteliální NOS potřebují k aktivaci vápenaté ionty a další kofaktory. Inducibilní NOS, která je aktivována cytokiny a jinými bakteriálními produkty, byla pozorována skoro ve všech typech buněk (dendritické buňky, fibroblasty, chondrocyty, osteoklasty, astrocyty, epitelální buňky) [43, 44]. NO může ale v organismu vznikat i neenzymově. Deoxyhemoglobin v červených krvinkách funguje jako nitrátreduktasa a z NO₂⁻ tak vzniká NO. V buňkách je NO oxidováno na NO₂⁻ nebo na NO₃⁻ [5, 45]. Jako volný radikál je NO velmi reaktivní a pro buňky toxický, protože poškozují enzymy a reaguje se superoxidy za vzniku peroxynitritu [46].



Obrázek 2: **Reakce katalyzovaná NOS a vznik endogenního NO.** NO je syntetizován z atomů dusíku L-argininu. Proces zahrnuje inkorporaci O₂ do nestabilního intermediátu N^ω-hydroxy-L-argininu a následně do L-citrulinu. K reakci jsou potřeba 2 molekuly kyslíku. Převzato z citace [5].

Hlavním cílem NO signalizace je sGC [19], která je blíže popsána v kapitole 1.2.2. (str. 11). Dalším cílem signalizace pomocí oxidu dusnatého je IV. komplex dýchacího řetězce (CcO). NO reverzibilně inhibuje CcO a je považován za fyziologický regulátor respirace. Koncentrace NO potřebná k regulaci se v organismu objevuje za fyziologických podmínek [44].

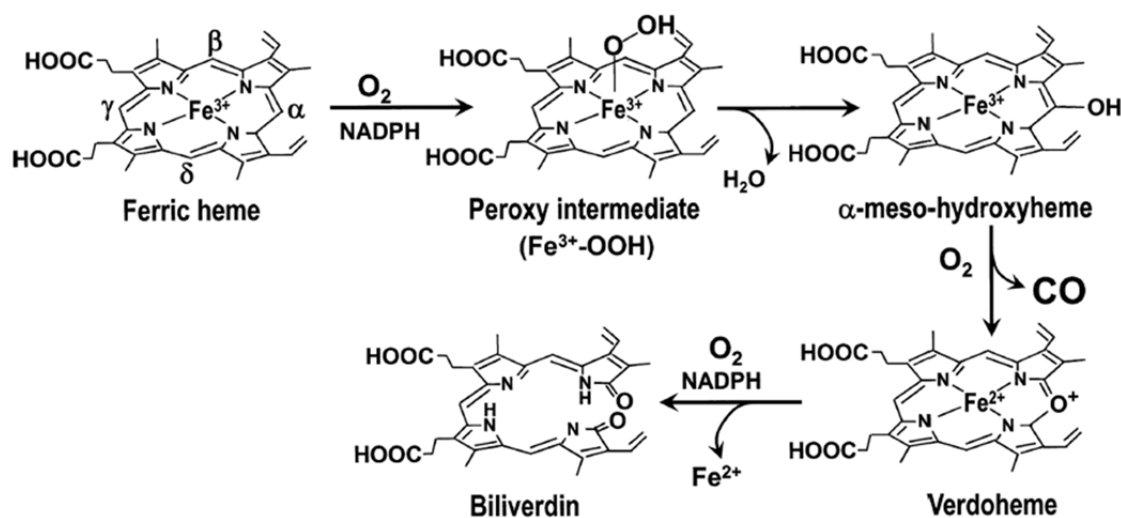
Produkce cGMP vede k potlačení aktivity caspas, vysoké dávky NO tedy mohou přispívat k inhibici apoptózy [43]. Signalizace pomocí oxidu dusnatého má v organismu významné postavení, ovlivňuje vaskulární systém, reguluje průtok krve a zajišťuje funkci různých orgánů a tkání. Narušení NO signalizace přispívá ke vzniku a rozvoji nemocí od srdečních poruch, hypertenze nebo mozkové mrtvice [19], přes gastrointestinální problémy [47], poruchy erekce až k neurologickým poruchám [48].

Molekulární podstata těchto pochodů není ještě úplně známa, ale pravděpodobně k signalizaci dochází prostřednictvím postrančních modifikací S-nitrosylace a nitrace tyrosinu [44]. Další způsob signalizace pomocí NO probíhá koordinací molekuly plynu k hemovému železu v hemových senzorových proteinech [19] (viz kapitola 1.2.2., str. 11).

1.3.2. CO

V lidském těle je hlavním zdrojem oxidu uhelnatého proces degradace hemu katalyzovaný hemoxygenasou. Většina hemu použitého k tvorbě CO pochází ze stárnoucích červených krvinek a také vzniká při špatné krevotvorbě, malé množství je také

získáváno z hemoproteinů, jako jsou myoglobin, katalasy, peroxidasy nebo cytochromy [5]. Hemoxygenasa katalyzuje 3 monooxygení reakce, při kterých konvertuje hem na biliverdin za současného vzniku CO a uvolnění iontu železa, v této enzymové reakci se také spotřebovávají redukované ekvivalenty. Biliverdin je pak konvertován na bilirubin. [5]. Tyto reakce jsou znázorněny na obrázku 3. Biliverdin i bilirubin působí jako silné antioxidanty a přispívají tak k ochraně buňky [49].



Obrázek 3: **Reakce katalyzované hemoxygenasou vedoucí k endogenní tvorbě CO.** Hemoxygenasa katalyzuje 3 reakce, v každé z nich je použita molekula kyslíku. Reakce je započata tvorbou komplexu Fe(III)-hemoxygenasa, Fe(III) je následně redukován na Fe(II). Další molekula kyslíku je potřeba k tvorbě verdohemu a produkci CO. Poslední molekula kyslíku spolu s redukovanými ekvivalenty je spotřebována na tvorbu biliverdinu a uvolnění železnatých iontů. Převzato z citace [5].

V některých vlastnostech se CO může podobat NO, například stejně jako NO aktivuje sGC [50]. CO může dále ovlivňovat aktivitu NOS jak v pozitivním, tak v negativním smyslu. Regulace aktivity NOS oxidem uhelnatým závisí na jeho koncentraci. Vysoká koncentrace CO inhibuje NOS, zatímco nižší koncentrace CO stimuluje jejich aktivitu [51]. Oxid uhelnatý také reguluje produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, z angl „reactive oxxygen species“) a jejich aktivitu. Vznik ROS je připisován úniku elektronů z transportního řetězce elektronů. CO zvyšuje produkci ROS vazbou na CcO (komplex IV. v transportním řetězci elektronů), která je inhibována a nedochází k využití kyslíku k tvorbě vody nýbrž k produkci dalších ROS. Vazbou na CcO se jednak zvýší únik elektronů z komplexu III, ale také dojde ke zpomalení transportu

elektronů [52]. Význam ROS pro organismus je blíže popsán v kapitole 1.3.4. (str. 22). Oxid uhelnatý dále ovlivňuje signalizační kaskádu mitogenem aktivovaných proteinkinasy (MAPK), které aktivují různé buněčné pochody jako je apoptóza, diferenciace, metabolismus, pohyblivost a dělení buněk [53]. CO také reguluje aktivitu iontových kanálů a ovlivňuje tak membránový potenciál [41]. V neposlední řadě CO reguluje i aktivitu CBS a tím ovlivňuje produkci H_2S [54], jehož význam je popsán v kapitole 1.3.3.

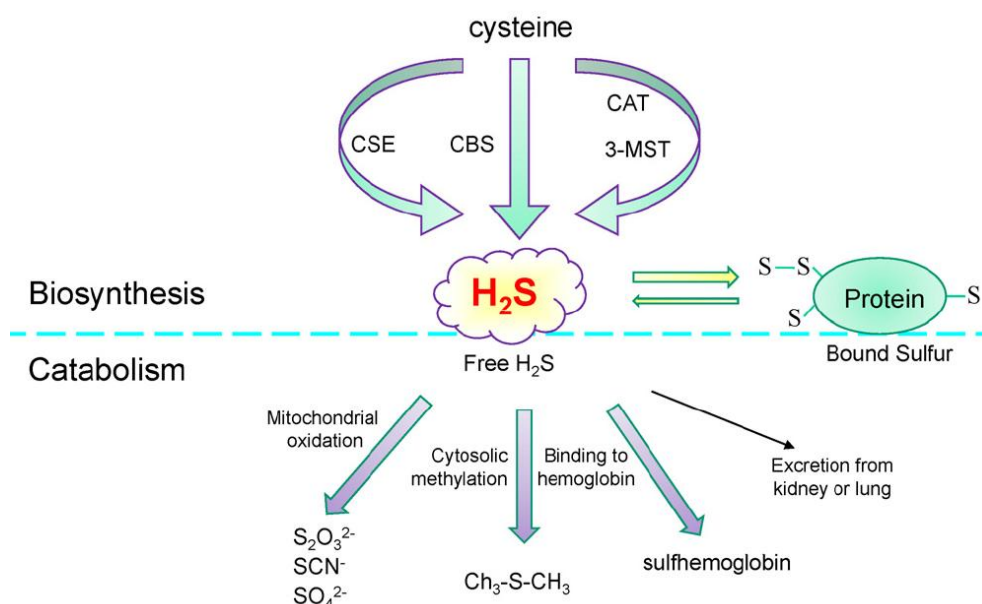
Endogenní přísně regulovaná nízká produkce CO je pro organismus nezbytná. Kontakt organismu s vysokou koncentrací převážně exogenního CO, který vzniká nedokonalým spalováním uhlíku a organických látek, je pro organismus nebezpečný a život ohrožující. Vazba CO na hem v hemoglobinu je velmi silná a znemožňuje tak vazbu kyslíku k hemu a jeho transport [52]. Při otravě oxidem uhelnatým pak nejvíce trpí mozek a srdce. Chronické vystavení oxidu uhelnatému přispívá k poškození srdečního svalu a vzniku fibrózy, vysoké akutní dávky CO způsobují arytmie a mohou vést k náhlé smrti [52].

1.3.3. H_2S

Sulfan byl vždy považován za velmi toxickou molekulu [55], avšak to, že endogenní H_2S zprostředkovává rozsáhlé množství fyziologických dějů, bylo objeveno teprve nedávno [56]. Mezi tyto fyziologické děje patří neuromodulace, kardioprotekce, relaxace hladkého svalstva [57] a indukce vasodilatace [58].

Důležitá otázka ale zní, jak v organismu tento endogenní sulfan vzniká. Produkce H_2S je v organismu zajištěna pomocí 3 hlavních enzymů (a) cystathionin β -syntasy (CBS), která katalyzuje přeměnu cysteinu na H_2S a serin, (b) cystathionin γ -lyasy (CSE), která vytváří thiocystein z cystinu a ten se pak přemění na cystein a H_2S , a (c) 3-mercaptopyruvát sulfotransferasy (3-MST). Substrát pro tuto třetí dráhu je tvořen prostřednictvím cystein aminotransferasy (CAT). CAT katalyzuje přeměnu cysteinu a ketokyseliny (např. α -ketoglutarát) na 3-mercaptopyruvát, který je pak pomocí 3-MST desulfurován za vzniku H_2S . [59]. Studie naznačují, že za majoritní produkci H_2S jsou zodpovědné právě CBS a CSE. 3-MST hraje jen minoritní roli v produkci endogenního H_2S [60]

První dva popsané enzymy zodpovědné za tvorbu H_2S tj. CBS, CSE potřebují jako kofaktor pyridoxalfosfát, 3-MST má jako kofaktor iont zinku. CBS a CSE působí pouze v cytosolu, zatímco 3-MST produkuje H_2S jak v cytosolu tak v mitochondriích [57, 59]. CBS je hlavním zdrojem H_2S v mozku zatímco CSE je spíše zodpovědná za produkci sulfanu v játrech a ledvinách [61]. 3-MST je exprimována v ledvinách, játrech, aortě, srdci a mozku [62, 63]. Sulfan se běžně v tkáních vyskytuje v 10-30 nM koncentraci, ale v aortě má 20-100x vyšší koncentraci (až 3 μM) [63]. Sulfan je analog vody, kde je kyslík nahrazen atomem síry. Velikost a elektronegativita atomu síry zvyšuje kyselost sulfanu oproti vodě, $\text{pK}_{\text{a}1}$ je 6,8 a $\text{pK}_{\text{a}2}$ je 14,1, ve vodném fyziologickém prostředí, kde je pH 7,4 jsou tedy 2/3 H_2S ve formě aniontu SH^- , S^{2-} se za fyziologických podmínek téměř nevyskytuje [64]. Biosyntéza a katabolismus sulfanu jsou zobrazeny na obrázku 4.



Obrázek 4: **Schéma biosyntézy, katabolismu a ukládání endogenního H_2S .** 3-MST: 3-merkaptopyruvát sulfotransferasa; CAT: cystein aminotransferasa; CBS: cystathionin β -syntasa; CSE: cystathionin γ -lyasa. Převzato z citace [53].

A jak je v organismu H_2S katabolizován? Například dochází k reakci sulfanu s methemoglobinem za tvorby sulfhemoglobinu. Dále může být sulfan oxidován na thiosulfát v mitochondriích, kde je následně konvertován na siřičitan nebo síran. Sulfan může také být methylován za vzniku methanthiolu a dimethylsulfidu. H_2S se řadí mezi

silné reduktanty, a tak je pravděpodobné, že bude také spotřebován endogenními oxidanty, jako jsou peroxynitrit, superoxid nebo peroxid vodíku [59].

H₂S působí jako vasorelaxant, tento efekt je připisován aktivaci adenosintrifosfát (ATP)-senzitivních K⁺ kanálů sulfanem [65]. Dále je zvažován i nepřímý mechanismus regulace těchto kanálů a to inhibicí CcO, což vede k poklesu hladiny ATP a tedy k aktivaci draslíkových kanálů [66]. Sulfan takto reguluje relaxaci hladkého svalstva [67], vazodilataci [68] a snižuje krevní tlak [69].

Sulfan má velký vliv na nervový systém, působí jako signální molekula v mozku a zprostředkovává dlouhodobou potenciaci neuronů. Tato potenciace je způsobena aktivací N-methyl-D-asparátových receptorů a aktivací Ca²⁺ kanálů, čímž zvyšuje přísun vápenatých iontů do gliových buněk. Otevření K⁺_{ATP} kanálů sulfanem chrání buňky hipokampu před excitotoxicitou a buněčnou smrtí [70]. H₂S také reguluje signální cesty v centrální nervové soustavě působením na různé kinasy (tyrosinkinasy, proteinkinasy) [53]. Dále sulfan zvyšuje množství glutathionu, čímž chrání neurony před buněčnou smrtí [59]. Regulace neurotransmise, která je zprostředkována kyselinou γ -aminomáselnou, glutamátem, katecholaminy a aminokyselinami, je také ovlivňována sulfanem [53].

Jako další účinek sulfanu může být uveden jeho vliv na angiogenezi neboli tvorbu nových krevních kapilár [71]. Neregulovaná produkce endogenního H₂S je také spojována se zánětlivými procesy [72,73]. Dále má sulfan antiapoptotické a antioxidační účinky [74] a moduluje intestinální kontraktilitu v gastrointestinálním traktu [75]. Nově byly objeveny účinky sulfanu u nehybernujících zvířat, H₂S přispívá ke snížení tělesné teploty, snížení metabolických nároků a zpomalení vlastního metabolismu, čímž vyvolá klidový stav podobný hibernaci [69].

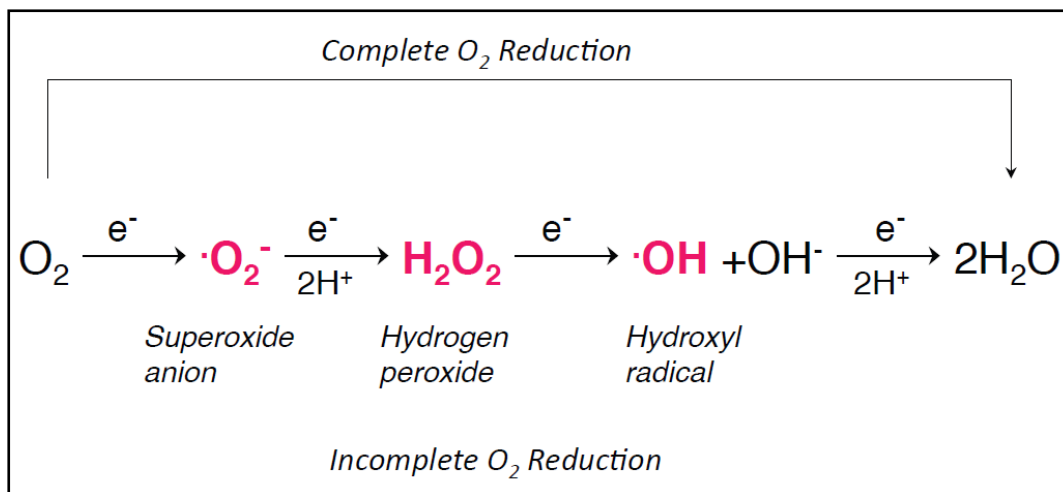
Molekulární mechanismy výše popsaných mechanismů nejsou zcela přesně známy. Signalizace pravděpodobně probíhá sulfhydratací elektrofilů, interakcí H₂S s S-nitrothioly nebo s ionty kovů. Tato interakce může probíhat dvěma způsoby, může dojít k redukci iontu železa nebo může vzniknout koordinovaný komplex. U hemoproteinů dochází k redukci iontu železa, když je aktivní místo proteinu polarizováno, pokud polarizováno není, dochází k tvorbě komplexu H₂S a hemu [70].

1.3.4. O₂

Kyslík je pravděpodobně nejdůležitější molekulou udržující život na Zemi, poprvé se objevila před 2,2 miliardami let. Hodnota kyslíku v atmosféře pak střídavě stoupala a klesala, v jednu chvíli se dostala až na 35%. Až když klesla na 21%, jak ji známe dnes, došlo k prudkému rozvoji organismů na Zemi [76].

Oxygenní fotosyntéza je proces probíhající v rostlinách a cyanobakteriích při kterém se z vody generuje kyslík. Přestože je O₂ nesmírně důležitý pro přežití buňky, pro tvorbu energie ve formě ATP, buňky organismů, kromě rostlin a některých bakterií, si ho neumí sami produkovat a musí být tedy přijímán z okolí. Většina kyslíku v těle je spotřebována CcO při oxidativní fosforylaci v dýchacím řetězci [5].

Stejně jako výše popsané signální molekuly má i molekula kyslíku negativní stránku, je to velmi silný oxidant, snadno přijímá elektrony a vznikají tak ROS – superoxidový anion radikál, peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál (viz obrázek 5, str. 23) [76]. ROS vznikají hlavně ztrátou elektronů z dýchacího řetězce, konkrétně z komplexu I a III, dále jsou ROS generovány nikotinamidadenindinukleotid-fosfát oxidasou [77]. Dalšími zdroji ROS mohou být enzymy jako například xanthinoxidasa, cyklooxygenasa a lipooxygenasa [77]. Rozsah poškození buněk těmito ROS je obrovský, poškozují lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a způsobují zlomy a adukty v DNA [76]. To může vést k vážným onemocněním jako je rakovina, neurodegenerativní choroby, ateroskleróza nebo cukrovka [78]. Buňky se s takovou hrozbou vyrovnávají pomocí různých antioxidačních systémů a enzymů. V první řadě jsou ROS likvidovány rodinou enzymů nazývaných superoxiddismutasy, ty katalyzují reakci, při které je superoxidový anion přeměněn na peroxid vodíku, ten dále funguje jako signální molekula nebo je dalšími enzymy, katalasami přeměněn na vodu a kyslík [78].



Obrázek 5: **Dvě cesty redukce molekulárního kyslíku.** *Vznik reaktivních forem kyslíku přidavkem jednoho elektronu. Převzato z citace [76].*

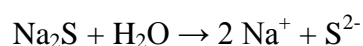
Některé bakterie jsou schopné se adaptovat při změně v množství přítomného kyslíku expresí různých genů. Exprese je kontrolována na úrovni transkripce senzorymi regulačními proteiny. K těmto proteinům patří FeS proteiny, konkrétně proteiny s [4Fe-4S] klastry, jejichž citlivost vůči kyslíku se adaptovala tak, aby naplnila regulační roli při přímé detekci environmentálního kyslíku [3]. Fe-S klastry zprostředkovávají odpověď buňky i na přítomnost ROS nebo NO [79].

Další způsob signalizace pomocí kyslíku je přes hemové senzorové proteiny, kde se vazbou kyslíku na hem v senzorové doméně předá signál funkční doméně, která se tak aktivuje nebo naopak deaktivuje [8]. Tento způsob signalizace je blíže popsán v kapitole 1.2.2. (str. 11).

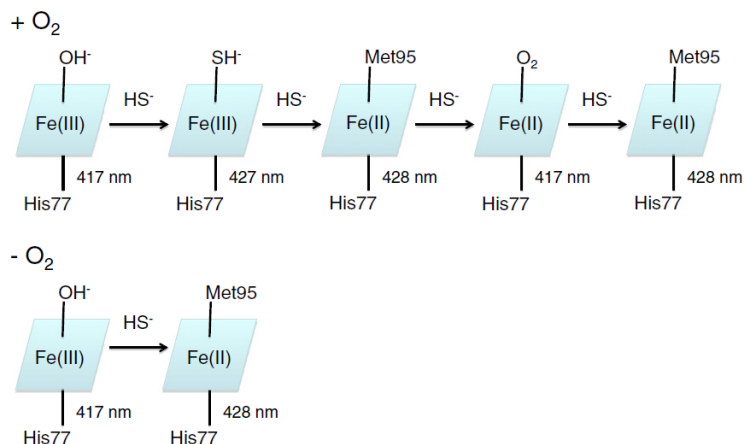
1.4. Vliv Na₂S na hemové senzorové proteiny

Do této doby byl popsán vliv Na₂S pouze u *Ec* DOS. *Ec* DOS je dvoudoménový hemoprotein se senzorovou doménou PAS na N-konci a funkční fosfodiesterasovou (PDE) doménou na C-konci [80]. PDE doména obsahuje GGDEF a EAL subdomény, název EAL pochází ze zachovaného motivu aminokyselin [81]. GGDEF subdoména běžně vykazuje diguanylylcyklasovou aktivitu a katalyzuje tak syntézu c-di-GMP v případě *Ec* DOS je

ovšem tato aktivita potlačena. Oproti tomu EAL subdoména s fosfodiesterasovou aktivitou je v případě *Ec* DOS velmi aktivní a rychle konvertuje c-di-GMP na lineární di-GMP [82]. Na rozdíl od jiných hem sensorových proteinů, jako je CoxA nebo FixL, které jsou schopné rozpoznat pouze jednu signální molekulu, aktivita *Ec* DOS vzroste jak při navázání kyslíku, tak při navázání jiné signální molekuly např. CO [82]. Aktivita *Ec* DOS vůči c-di-GMP vzroste 6x po navázání O₂ na železnaté ionty hemu v sensorové doméně. Navázání dalších signálních molekul jako například NO nebo CO také významně ovlivňuje PDE aktivitu proteinu [80]. Zda by se k signálním molekulám mohl přiřadit i H₂S je v této době předmětem rozsáhlého výzkumu. H₂S se účastní mnoha fyziologických procesů jak v eukaryotických buňkách, tak u zvířat [65-75]. Více je o účincích sulfanu zmíněno v kapitole 1.3.3 (str. 19). Jak sulfan ovlivňuje sensorovou doménu *Ec* DOS bylo pozorováno spektrofotometricky. K proteinu byl přidán roztok Na₂S, který disociuje podle reakcí:



Během několika minut kontaktu Na₂S s *Ec* DOS (v poměru 5000:1) byl pozorován vznik směsi 2 komplexů a to Fe(III)-SH a Fe(II)-O₂. V delších časových intervalech byl pozorován nárůst množství proteinu obsahujícího Fe(II)-O₂ komplex. Při delších časových intervalech došlo ke konverzi komplexu Fe(II)-O₂ na Fe(II) komplex. Za anaerobních podmínek došlo k rychlé konverzi z Fe(III)-SH komplexu přímo na Fe(II) komplex přes isosbestický bod, takže žádné další komplexy nebyly vytvořeny [80]. Schéma interakce *Ec* Dos se sulfanem je zobrazeno na obrázku 6 (str. 25).



Obrázek 6: **Mechanismus indukce katalytické aktivity *Ec* DOS účinkem Na_2S .** Po přidání Na_2S k *Ec* DOS došlo k nárůstu fosfodiesterasové aktivity proteinu. Za aerobních podmínek k tomu přispívají 3 různé efekty: vazba axiálního ligandu SH^- , tvorba komplexu Fe(II)-O_2 a modifikace cysteinylových zbytků v katalytické doméně. Za anaerobních podmínek došlo ke konverzi z Fe(III) komplexu přímo na Fe(II) komplex bez větších změn v katalytické aktivitě. Převzato z citace [80].

Takahashi *et al.* také studoval vliv sulfanu na enzymovou aktivitu *Ec* DOS. Byla pozorována změna v aktivitě funkční domény po přidání Na_2S . Za aerobních podmínek byla fosfodiesterasová aktivita až 30x vyšší po přidání Na_2S . Za anaerobních podmínek byl nárůst aktivity méně výrazný [80].

K zajímavým výsledkům dospěl Du *at al.* při studiu vlivu Na_2S na mutanty *Ec* DOS. Arginin 97 ve struktuře *Ec* DOS tvoří vazebné místo pro kyslík. *Ec* DOS s mutací v tomto místě změnil svou enzymovou aktivitu po interakci s Na_2S z kyslíkového senzoru na hemoxygenasu. *Ec* DOS s hemoxygenasovou aktivitou modifikoval hem na verdohem [84].

2. Cíl práce

Na začátku řešení dané diplomové práce byly vytčeny tyto cíle:

1. Izolovat modelové hemové sensorové proteiny, konkrétně *A/GcHK* a *YddV* a jejich mutanty obsahující mutace klíčových aminokyselin zodpovědných za interakci s kyslíkem.
2. Studovat interakce Na_2S se sensorovou doménou modelových sensorových proteinů. Tato doména obsahuje hem, a vykazuje tedy typická absorpční spektra v UV-Vis oblasti. Této vlastnosti je možné využít k pozorování interakce mezi Na_2S a hemem respektive jeho bezprostředním okolím, protože taková interakce se projeví změnou UV-Vis spekter.
3. Studovat vliv interakce Na_2S se sensorovou doménou modelových sensorových proteinů na enzymovou aktivitu funkční domény. Zároveň prověřit vliv Na_2S na enzymovou aktivitu modelových sensorových proteinů, které neobsahují v sensorové doméně hem (tedy jsou v apoformě).

3. Materiál a metody

3.1. Použité přístroje

Autokláv:

Varioklav 400E (H+P Labortechnik)

Automatické pipety:

Pipetman (Gilson), finnpipette F1 (Thermo Scientific), NichipetEX

Centrifugy:

Centrifuge 5415 R (Eppendorf), Janetzki K70 (MLW), ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter) úhlový rotor Ti 45, Z 383 K (Hermle)

Elektrický ohřívač:

ETA

Elektroforetická aparatura:

Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad)

Inkubátory:

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator (Flow Laboratories), ORBI-SAFE TS NetWise (Gallenkamp), G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Edison, N.J. USA), FNOICE (Techne)

Laboratorní váhy:

440-35N (KERN), MXX-601 (Denver Instrument), analytické váhy 40 SM-200A (Pesa), HM-200 (A&D Instruments LTD)

Laminární box:

Biohazard Box BIO 126 (Labox)

Magnetické míchačky:

F-301N (Fine), KMO2 basic (IKA)

pH metr:

HI 2211 (Hanna Instruments)

Spektrofotometry:

Diode Array 8453 (Hewlett Packard), Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena), Sunrise Absorbance Reader (TECAN), Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies)

Systém rychlé proteinové kapalinové chromatografie (FPLC, z angl „fast protein liquid chromatography):

ÄKTA FPLC, UPC 900 detektor, P 900 pumpa (GE Health Care)

Třepačka:

Mini Rocker MR-1 (BioSan)

Ultrazvukový homogenizátor:

SONOPULS HD 3100, sonda KE76 (BANDELIN)

Vodní lázeň:

Julabo TW2 (JULABO Labortechnik GmbH)

Zdroj pro elektroforézu:

EPS 301 (Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech)

3.2. Použité chemikálie

AppliChem, Německo:

δ-aminolevulová kyselina

Clontech, USA:

TALON Metal Affinity Resin

Fermentas, Kanada:

Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein ladder

Fluka, Švýcarsko:

dodecylsírán sodný (SDS), akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), 2-merkapto-ethanol, fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), lysosym, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Frontier Scientific, Inc., USA:

chlorid heminu

GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden:

Glutathion sepharosa 4B

Lach-Ner, ČR:

kyselina octová, glycerol, chlorid draselný (KCl)

Lachema Brno, ČR:

dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), persíran amonný (APS), ethanol, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), uhličitan sodný (Na_2CO_3), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), hydrohenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4), chlorid hořečnatý (MgCl_2), chlorid sodný (NaCl), bromfenolová modř, kyselina chlorovodíková (HCl), ethylmethylketon (butanon), vínán sodnodraselný, chlorid manganatý (MnCl_2)

Linde, Česká republika:

kapalný dusík

NARD Institute, Ltd, Japonsko:

1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato manganatý komplex (phos-tag)

OXOID LTD, Anglie:

tryptone, yeast extract

Merck, Německo:

Glutathion

Penta, ČR:

hydrogenfosforečnan didraselný (K_2HPO_4), glycin, hydroxid sodný (NaOH)

SERVA Elektrophoresis, Německo:

N, N, N', N'-tetramethylethylenediamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, ATP
ampicilin

Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Německo:

Spectra Por Visking Dialysis Tubing, Type 20/32

Sigma, USA:

isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), Luria Agar, Luria Broth (LB) medium,
dimethylsulfoxid (DMSO), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), imidazol,
kanamycin, sulfid sodný (Na_2S)

Sevapharma, Česká republika:

hovězí sérový albumin

Stratagen, USA:

bakteriální kmen *E. coli* BL-21(DE3)

Plasmidy pET-21c/AfGcHK WT, pET-21c/AfGcHK L68F, pET-21c/AfGcHK L68G, pET-21c/AfGcHK L68N, pET-21c/AfGcHK L68V, pET-21c/AfGcHK Y45F, pET-21c/AfGcHK Y45L, pET-21c/AfGcHK Y45W, pET-21c/YddV WT, pET-21c/YddV L65G, pET-21c/YddV L65M, pET-21c/YddV L65Q, pET-21c/YddV L65T, pET-21c/YddV Y43A, pET-21c/YddV Y43F, pET-21c/YddV Y43W, pET-28a/YddV-HD WT, pET-28a/YddV-HD L65G, pET-28a/YddV-HD L65M, pET-28a/YddV-HD L65Q, pET-28a/YddV-HD L65T, pET-28a/YddV-HD Y43A, pET-28a/YddV-HD Y43F, pET-28a/YddV-HD Y43W a pGEX-6P-2/RR byly poskytnuty spolupracující laboratoří profesora Toru Shimizu, Tohoku Universita, Sendai, Japonsko.

3.3. Použité metody

3.3.1. Transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Agarové plotny byly připraveny následujícím způsobem. 4 g Luria Agar byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a převedeny do zásobní lahve. Agar byl sterilizován horkou parou při teplotě 121°C v autoklávu (Varioklav 400E) po dobu 20 minut. Bezprostředně před přípravou byl agar rozpuštěn v mikrovlnné troubě. Po

zchladnutí bylo 20 ml agarů přeneseno do sterilní zkumavky Falcon (50 ml). Do zkumavky s agarem bylo přidáno 20 µl antibiotika. V případě AfGcHK a RR byl použit ampicilin o koncentraci 100 mg/ml. V případě YddV byl použit kanamycin o koncentraci 60 mg/ml. Směs ve zkumavce byla promíchána a přenesena na sterilní plastové Petriho misky. Práce byla provedena v laminárním boxu (Biohazard Box BIO 126, Labox). Petriho misky byly ponechány v laminárním boxu při laboratorní teplotě, dokud agar opět nezpolymerizoval.

Pro expresi genu kódujícího protein AfGcHK, RR a YddV byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL-21 (DE3). 20 µl těchto buněk bylo pipetováno do dvou sterilních mikrozkuvek Eppendorf. Do jedné z nich bylo přidáno 0,5 µl příslušného plasmidu. Práce byla provedena v laminárním boxu (Biohazard Box BIO 126, Labox). Druhá mikrozkuvka sloužila jako kontrola. Mikrozkuvky byly ponechány 45 minut na ledu.

Mikrozkuvky s kompetentními buňkami byly na 45 sekund vloženy do vodní lázně (Julabo TW2, JULABO Labortechnik GmbH) vyhřáté na 42°C a poté přemístěny zpět na led na 3 minuty. Mikrozkuvky byly následně přeneseny do laminárního boxu (Biohazard Box BIO 126, Labox). K buňkám bylo přidáno 200 µl sterilního Luria Broth media (LB media), které bylo připraveno rozpuštěním 2,5 g Luria Broth ve 100 ml destilované vody a sterilizováno horkou parou při 121°C v autoklávu (Varioklav 400E) po dobu 20 minut. Směs v mikrozkuvkách byla ponechána inkubovat 1 hodinu při 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories). Celý objem mikrozkuvek byl poté pipetován na agarové plotny. Sterilní mikrobiologickou hokejkou byla suspenze rovnoměrně rozetřena po celém povrchu agarů. Práce byla provedena v laminárním boxu (Biohazard Box BIO 126, Labox). Misky byly otočeny dnem vzhůru a ponechány v inkubátoru při 37°C přes noc (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Plotny byly uchovány v lednici při 4°C pro další užití.

3.3.2. Expres proteinů AfGcHK, RR a YddV

Terrific Broth medium (TB medium) bylo připraveno následujícím způsobem. 48 g Bacto Tryptone a 96 g Bacto Yeast extract bylo rozpuštěno ve 3,6 l destilované vody. Celý objem byl rozdělen do Erlenmayerových lahví po 450 ml. Láhve byly uzavřeny alobalovou

zátkou a sterilizovány horkou parou při 121°C v autoklávu (Varioklav 400E) po dobu 20 minut.

9,2 g KH_2PO_4 , 50 g K_2HPO_4 a 32 ml 50% glycerolu bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Celý objem byl převeden do zásobní láhve a sterilizován horkou parou při 121°C v autoklávu (Varioklav 400E) po dobu 20 minut.

Před použitím bylo do každé Erlenmayrový láhve přidáno 50 ml sterilního roztoku fosfátů s glycerolem.

Následovala kultivace buněk *E. coli* BL-21 (DE3). 5 ml sterilního LB media bylo přeneseno do zkumavky Falcon (50 ml). K LB mediu bylo pipetováno 5 μl antibiotika. V případě AfGcHK a RR byl použit ampicilin o koncentraci 100 mg/ml. V případě YddV byl použit kanamycin o koncentraci 60 mg/ml. Do této zkumavky byla přeočkována jednobuněčná kolonie. Přeočkování proběhlo v laminárním boxu (Biohazard Box BIO 126, Labox) pomocí vyžíhané pinzety a sterilního párátko. Směs byla přes noc inkubována při 37°C a 220 RPM (G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Edison, N.J. USA)

Do Erlenmayrových lahví s 0,5 l TB media bylo pipetováno 0,5 ml antibiotika, v případě AfGcHK a RR se jednalo o ampicilin o koncentraci 100 mg/ml a v případě YddV se jednalo o kanamycin o koncentraci 60 mg/ml, a 0,5 ml LB media s obsahem transformovaných buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Láhve byly vloženy do orbitální míchačky a směs byla ponechána inkubovat při 37°C a 150 RPM (ORBI-SAFE TS NetWise, Gallenkamp) do doby, než optická denzita buněk při 600 nm nedosáhla hodnotu 0,6. Optická denzita byla měřena na spektrofotometru Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena).

Ve chvíli, kdy optická denzita při 600 nm dosáhla danou hodnotu, byla zahájena exprese proteinu AfGcHK, RR nebo YddV přidáním 0,1 mM IPTG do každé láhve. V případě exprese proteinu YddV byla do každé láhve přidána 0,15 mM kyselina δ -aminolevulová. Následovala inkubace v orbitálním shakeru při 18°C a 150 RPM (ORBI-SAFE TS NetWise, Gallenkamp). Po 18 hodinách byla exprese ukončena. Suspenze buněk byla rozdělena do kyvet a centrifugována při 4°C a 3000 RPM (Janetzki K70, MLW) po dobu 30 minut. Peleta byla přenesena do předem zvážených zkumavek Falcon (50 ml). Celá zkumavka se sklizenými buňkami byla znovu zvážena za účelem zjištění buněčného

výtěžku. Sklizené buňky s exprimovanými proteiny pak byly zmrazeny a uchovány při teplotě -80°C.

3.3.3. Izolace proteinů AfGcHK, RR a YddV

Buňky o hmotnosti 6-8 g získané postupem popsáním v kapitole 3.3.2. (str. 31) byly rozmrazeny na ledu a resuspendovány v 25 ml pufru, který obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF a 0,2 mg/ml lysozymu. Ultrazvukovou sonikací (SONOPULS HD 3100, sonda KE76, BANDELIN) ve vodní lázni s ledem byly rozrušeny buněčné membrány. Sonikace byla provedena 6 x po dobu 1 minuty (mezi jednotlivými sonikacemi byla 1 minutová pauza). V případě AfGcHK byl k buněčnému lyzátu přidán 300 µM hemin rozpuštěný v DMSO. Při izolaci RR a YddV byl tento krok vynechán. Celý objem směsi byl centrifugován 65 minut při 4°C a 55000 RPM (Optima™ LE-80K, Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 45). Ze supernatantu byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, z angl. „sodium dodecyl sulfate polyakrylamid gel electrophoresis“) (vz. č. 1, kapitola 3.3.5.1., str. 37). Supernatant byl přesunut do uzavíratelné nádoby (100 ml).

Afinitní chromatografií byl poté izolován velmi čistý protein AfGcHK, RR nebo YddV. AfGcHK a YddV obsahují na svém C-konci histidinovou kotvu, k jejich izolaci byl tedy použit Talon, izolovaný RR protein obsahuje GST kotvu a k jeho izolaci byla použita glutathion sepharosa.

Talon byl nejprve resuspendován v 10 ml pufru A, který obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 100 mM NaCl, a poté centrifugován 2 minuty při 4°C a 700 RPM (Z 383 K, Hermle). Proces byl opakován 4x. Afinitní gel byl poté resuspendován v malém množství pufru A a přidán k supernatantu. Směs gelu se supernatantem byla inkubována 45 minut na horizontální třepačce s minimální frekvencí změny polohy (60 RPM) (Mini Rocker MR-1, BioSan), vždy po 15 minutách byla směs důkladně promíchána. Výsledná směs byla převedena na chromatografickou kolonu s fritou a promyta 100 ml pufru A. Z eluátu byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS-PAGE (vz. č. 2, kapitola 3.3.5.1. str. 37). Zachycený protein byl z chromatografické kolony eluován 10 ml pufru, který obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl a 10 mM imidazol, a 15 ml pufru, který obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl a 200 mM imidazol. Z frakce eluované pufrem, který

obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl a 200 mM imidazol, byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS-PAGE (vz. č. 3, kapitola 3.3.5.1., str. 37).

Glutathion sepharosa byla nejprve resuspendována v 10 ml pufru C, který obsahoval 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 buffer pH 7.5, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, a poté centrifugována 2 minuty při 4°C a 700 RPM (Z 383 K, Hermle). Proces byl opakován 4x. Glutathion sepharosa byla poté resuspendována v malém množství pufru C a přidána k supernatantu. Směs gelu se supernatantem byla inkubována 45 minut na horizontální třepačce s minimální frekvencí změny polohy (60 RPM) (Mini Rocker MR-1, BioSan), vždy po 15 minutách byla směs důkladně promíchána. Výsledná směs byla převedena na chromatografickou kolonu s fritou a promyta 10 ml pufru C. Z eluátu byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS-PAGE (vz. č. 2, kapitola 3.3.5.1., str. 37). Zachycený protein byl z chromatografické kolony eluován 30 ml roztoku obsahujícího 10 mM redukovaný glutathion v 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Z eluované frakce byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS-PAGE (vz. č. 3, kapitola 3.3.5.1., str. 37).

Aby mohl být imidazol (v případě A/GcHK) nebo glutathion (v případě RR proteinu) z roztoku odstraněn gelovou chromatografií, byl roztok nejprve převeden do zkumavky Millipore (cut off 30000) a koncentrován centrifugací při 4 °C a 4000 RPM (Z 383 K, Hermle) na 1,5 ml. Roztok byl vždy po 1 minutě promíchán a dále centrifugován, dokud nebylo dosaženo požadovaného objemu. Dalším krokem izolace byla rychlá proteinová kapalinová chromatografie (FPLC, z angl „fast protein liquid chromatography“) (ÄKTA, UPC 900, P 900, GE Health Care), jejíž podmínky byly následující: byla použita kolona typu Superdex200 10/300 GL, jako mobilní fáze byl použit pufr obsahující 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 150 mM NaCl, rychlost průtoku byla 0,5 ml/min a objem nástřiku byl 0,5 ml. Roztok proteinu byl po gelové chromatografii opět koncentrován způsobem popsáným výše (ve stejné zkumavce Millipore) až na 800 μl . Koncentrované preparáty byly znovu centrifugovány při 4°C a 16 100 RPM (5415 R, Eppendorf) aby byly odstraněny agregáty případně vzniklé při koncentraci preparátů. Z takto koncentrovaného roztoku proteinu byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS-PAGE (vz. č. 4, kapitola 3.3.5.1., str. 37). Roztok proteinu byl rozdělen do alikvotů po 30 μl . Jednotlivé alikvoty byly zamrazeny kapalným dusíkem a uchovány při teplotě -80 °C.

V případě YddV proteinu byl imidazol z roztoku odstraněn dialýzou přes noc. Roztok byl přenesen do dialyzačního střívka a dialyzován proti 4 x 2 l 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Po skončení dialýzy byl roztok přenesen do zkumavky Falcon (15 ml) centrifugován 35 minut při 4 °C a 5000 RPM (Z 383 K, Hermle), aby byly odstraněny agregáty vzniklé při dialýze. Roztok byl poté převeden do zkumavky Millipore (cut off 10000) a koncentrován centrifugací při 4 °C a 4000 RPM (Z 383 K, Hermle) na 800 µl. Roztok proteinu byl rozdělen do alikvotů po 30 µl. Jednotlivé alikvoty byly zamrazeny kapalným dusíkem a uchovány při -80 °C.

Procentuální zastoupení holoformy daných hemoproteinů (*AfGcHK* a YddV) bylo vypočítáno z R_z poměru. R_z poměr je poměr absorbance Soretova pásu k absorbanci při 280 nm. Za 100% holoformu je považován protein s R_z poměrem 2,2 a vyšším [36, 38]. Spektra byla měřena na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies).

3.3.4. Příprava apoformy *AfGcHK*

Pro přípravu apoformy byly vybrány tyto proteiny: *AfGcHK* WT, *AfGcHK* L68F a *AfGcHK* Y45W. Procentuální zastoupení holoformy těchto proteinů bylo vypočítáno z R_z poměru. R_z poměr je poměr absorbance Soretova pásu k absorbanci při 280 nm. Za 100% holoformu je považován protein s R_z poměrem 2,2 a vyšším [36]. Spektra byla měřena na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies).

3.3.4.1. Příprava apoformy *AfGcHK* WT, *AfGcHK* L68F, *AfGcHK* Y45W a *AfGcHK* H99A vynecháním inkubace s heminem během izolace

Pro přípravu apoformy *AfGcHK* WT, *AfGcHK* L68F, *AfGcHK* Y45W a *AfGcHK* H99A byl použit postup popsáný v kapitolách 3.3.1. (str. 30), 3.3.2. (str. 31) a 3.3.3. (str. 33). Při izolaci proteinu byl vynechán krok, ve kterém byl k buněčnému lyzátu přidán roztok heminu.

3.3.4.2. Ethylmethylketonová extrakce *AfGcHK* WT

Vzorek proteinu byl 20x zředěn do 2 ml. pH bylo upraveno 1M HCl na hodnotu 2,5. Celý objem byl přenesen do dělicí nálevky. K roztoku proteinu bylo přidáno stejné množství ethylmethylketonu. Dělicí nálevkou bylo opatrně třepáno 3 x 5 minut. Dělicí

nálevka byla ponechána v lednici při 4°C po dobu 15 minut, aby došlo k úplnému oddělení fází. Vodná fáze byla následně jímána do mikrozkušavky Eppendorf.

Obsah zkumavky byl přenesen do dialyzačního střívka. Následovala dialýza oproti 2 l vody, která probíhala 1 hodinu. Následně probíhala dialýza oproti 2 l 10 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0, který obsahoval, po dobu 1 hodiny. Dále proběhla dialýza proti 3 x 2 l pufru, který obsahoval 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 150 mM NaCl po dobu 3 hodin.

3.3.4.3. Příprava apoformy *AfGcHK* WT, *AfGcHK* L68F a *AfGcHK* Y45W heterologní exprese při 37°C po dobu 5 hodin

Pro přípravu apoformy *AfGcHK* WT, *AfGcHK* L68F a *AfGcHK* L45W byl použit postup popsáný v 3.3.1. (str. 30), 3.3.2. (str. 31) a 3.3.3. (str. 33). Některé kroky exprese byly upraveny tak, aby došlo k expresi proteinu bez interakce s hemem. Byla zkrácena doba exprese na 5 hodin od přidání IPTG a teplota media v době exprese byla udržována na 37°C. Při izolaci proteinu byl vynechán krok, ve kterém byl k buněčnému lyzátu přidán roztok heminu.

3.3.5. SDS-PAGE

Mezi 2 skla, 1 sklo kratší a 1 sklo se „spacing“, byla automatickou pipetou nanесena směs pro separační gel (12%). Směs se skládala z 3 ml pufru, který obsahoval 0,375 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8, 2 ml polymeračního roztoku, který obsahoval 30% (w/v) akrylamid a 0,8% (w/v) BIS, 50 µl 10% APS a 5 µl TEMED. Směs ve sklech byla převrstvena vodou a ponechána polymerovat.

Po 20 minutách, kdy byl gel dostatečně polymerovaný, byla odstraněna voda a prostor byl vysušen filtračním papírem. Mezi skla byla poté automatickou pipetou nanесena směs pro zaostřovací gel. Tato směs se skládala z 1,7 ml pufru, který obsahoval 0,125 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,8, 267 µl polymeračního roztoku, který obsahoval 30% (w/v) akrylamid a 0,8% (w/v) BIS, 40 µl 10% APS a 2 µl TEMED. Do směsi byl ihned po nanесení vložen 10 nebo 15 jamkový hřeben. Směs byla ponechána polymerovat 20 minut.

Pomocí skel s gelem a náhradní plastové destičky byla sestavena elektroforetická aparatura (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad), která byla vložena do elektroforetické vany. Ze zaostřovacího gelu byl vyjmut hřeben. Aparatura i elektroforetická vana byly následně naplněny elektrodovým pufrům, který obsahoval 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycin a 0,1% (w/v) SDS. Do jamek zaostřovacího gelu byly Hamiltonovou stříkačkou nanášeny vzorky o objemu 5 μ l a standard (PageRuler Unstained Broad Range protein ladder č. 26630) o objemu 3 μ l. Příprava vzorku je popsána v kapitole 3.3.5.1. (str. 37). Elektroforéza probíhala 1 hodinu a 5 minut při napětí 200 V (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Biotech) a pokojové teplotě. Po ukončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel a separační gel byl vložen do Petriho misky s barvicím roztokem, který obsahoval 25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 46% (v/v) ethanol a 9,2% (v/v) kyselinu octovou. Gel byl ponechán v barvicí lázni za stálého míchání po dobu 1 hodiny. Barvicí roztok byl následně vyměněn za odbarvovací lázeň obsahující 25% (v/v) ethanol a 10% (v/v) kyselinu octovou. Odbarvovací lázeň byla vždy po 60 minutách vyměněna. Gel byl dostatečně odbarven přibližně za 4 hodiny při stálém míchání.

3.3.5.1. Příprava vzorků pro SDS-PAGE

K odebraným vzorkům roztoků během izolačních kroků (viz kapitola 3.3.3., str. 33) bylo přidáno odpovídající množství 4x koncentrovaného vzorkového pufru, který obsahoval 0,25 M Tris-HCl, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) glycerol, 20% (v/v) 2-merkapt ethanol a 0,012% (w/v) bromfenolovou modř. Přesné složení vzorků nanášených na SDS-PAGE je uvedeno v tabulce 1. Takto připravené vzorky byly vystaveny teplotě 100 °C po dobu 3 minut a následně aplikovány na gel

Tabulka 1: Složení vzorků použitých pro stanovení čistoty izolovaných proteinů pomocí SDS-PAGE.

| Vzorek nanášený na SDS-PAGE č. | V vzorek roztoků [μ l] | V vzork. pufr [μ l] | V dest. voda [μ l] |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 3 | 5 | 12 |
| 2 | 3 | 5 | 12 |
| 3 | 5 | 5 | 10 |
| 4 | 1 | 5 | 14 |

3.3.6. Stanovení koncentrace proteinu

Pro stanovení koncentrace proteinů pomocí metody používající BCA jako reagent bylo smícháno 9 μ l zředěného vzorku proteinu (tak aby výsledná koncentrace proteinů byla v rozmezí 0,125 mg/ml – 2 mg/ml) s 260 μ l reakčního činidla. Toto činidlo obsahovalo 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃, 2% Na₂CO₃ a 0,16% vlnan sodnodraselný, 1% CuSO₄.5H₂O, a 1% BCA. Činidlo bylo připraveno vždy bezprostředně před každým stanovením. Výsledný roztok byl inkubován při 37°C po dobu 30 minut (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories) a následně byla jeho absorbance při 562 nm změřena na spektrofotometru (Sunrise Absorbance Reader, TECAN). Jako standard pro sestavení kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin o koncentracích 0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml a 2 mg/ml.

3.3.7. Spektrální analýza vlivu Na₂S na charakteristická UV-Vis spektra modelových proteinů (AfGcHK a YddV)

Vzorek modelových proteinů byl pro spektrální analýzu naředěn 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 tak, aby výsledná koncentrace v 400 μ l roztoku byla 5 μ M. Spektra byla měřena proti slepému vzorku, který obsahoval pouze pufr (20 mM Tris-HCl, pH 8,0) na spektrofotometru Diod Array 8453 (Hewlett Packard). Nejprve bylo naměřeno základní spektrum studovaného proteinu. K roztoku byl poté přidán 5 mM roztok Na₂S a spektra byla měřena po dobu 2 hodin. První hodinu bylo spektrum zaznamenáno každých 30 vteřin, druhou hodinu každých 10 minut. Všechny spektroskopické studie byly prováděny při pokojové teplotě.

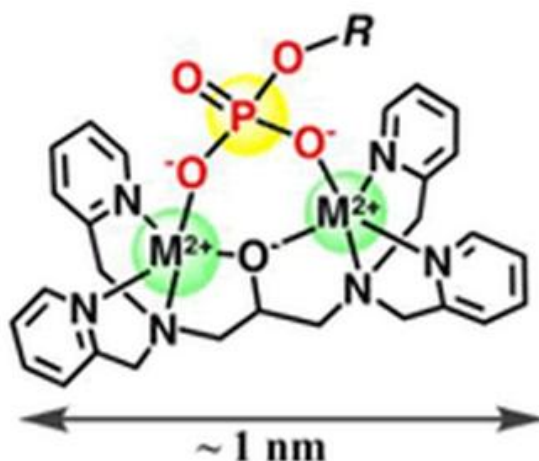
3.3.8. Studium enzymových aktivit modelových proteinů a měření vlivu Na₂S na tyto aktivity

Pokud v textu není uvedeno jinak, pak typická pre-inkubační směs obsahovala 10 μ M protein, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ a 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. K pre-inkubační směsi byl přidán roztok Na₂S v poměru 1:1000 (protein:Na₂S). Proměnným parametrem byla doba působení Na₂S na protein. K jednotlivým vzorkům byl po určitém čase přidán roztok ATP tak, aby výsledná koncentrace v roztoku byla 1 mM. Dále byl k některým vzorkům přidán RR protein tak, aby výsledná koncentrace byla 10 μ M, popřípadě pouze pufr obsahující 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 150 mM NaCl. Doba pre-inkubace směsi s Na₂S

korespondovala s významnými spektrálními změnami studovaných proteinů (viz kapitola 3.3.7., str. 38). Vlastní enzymová reakce byla iniciována přidavkem ATP. Reakce probíhala při 20°C (FNOICE, Techne) a byla po 60 s inkubace s ATP zastavena přidáním 50 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru, jehož složení je popsáno v kapitole 3.3.4. (str. 35). Výsledná směs nebyla vystavena varu. Tato směs byla analyzována metodou phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9.).

3.3.9. Phos-tag SDS-PAGE

Toto stanovení vychází z předpokladu, že fosforylovaný protein v interakci s phos-tagem za přítomnosti Mn^{2+} iontů se bude pohybovat v elektrickém poli pomaleji než stejný protein bez fosforylace. Vazba phos-tagu na protein je zobrazena na obrázku 7 [85].



Obrázek 7: **Komplex phos-tagu s fosforylovanou formou proteinu (zde označen jako R).** Phos-tag se váže na fosforylovaný protein a zpomaluje tak jeho průchod gelem při elektroforéze. Převzato z citace [85].

Pomocí phos-tag SDS-PAGE bylo stanoveno, jak sulfid sodný ovlivňuje kinasovou enzymovou aktivitu modelového proteinu A/GCHK.

Mezi 2 skla, 1 sklo kratší a 1 sklo se „spacing“, byla automatickou pipetou nanášena směs pro separační gel (12%). Směs se skládala z 3,25 ml pufru obsahujícího 0,375 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8, 1,63 ml polymeračního roztoku, který

obsahoval 30% (w/v) akrylamid a 0,8% (w/v) BIS, 48,7 μ l 10% APS, 100 μ l 10 mM MnCl_2 , 37,5 μ l phos-tag a 4,87 μ l TEMED. Směs ve sklech byla převrstvena vodou a ponechána polymerovat.

Po 20 minutách, kdy byl gel dostatečně polymerovaný, byla odstraněna voda a prostor byl vysušen filtračním papírem. Mezi skla byla poté automatickou pipetou nanесena směs pro zaostřovací gel. Tato směs se skládala z 1,7 ml pufru obsahujícího 0,125 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,8, 267 μ l polymeračního roztoku, který obsahoval 30% (w/v) akrylamid a 0,8% (w/v) BIS, 40 μ l 10% APS a 2 μ l TEMED. Do směsi byl ihned po nanесení vložen 15 jamkový hřeben. Směs byla ponechána polymerovat 20 minut.

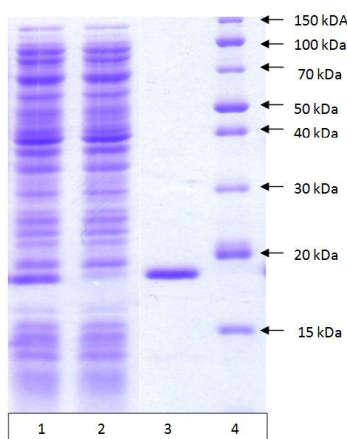
Pomocí skel s gelem a náhradní plastové destičky byla sestavena elektroforetická aparatura (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad), která byla vložena do elektroforetické vany. Ze zaostřovacího gelu byl vyjmut hřeben. Aparatura i elektroforetická vana byly následně naplněny elektrodovým pufrem, který obsahoval 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycín a 0,1% (w/v) SDS. Do jamek zaostřovacího gelu byly nanесeny Hamiltonovou stříkačkou vzorky o objemu 2,5 μ l. Příprava vzorku je popsána v kapitole 3.3.8. (str. 38). Elektroforéza probíhala 1 hodinu a 5 minut při napětí 200 V (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Biotech) a pokojové teplotě. Po ukončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel a separační gel byl vložen do Petriho misky s barvicím roztokem, který obsahoval 25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 46% (v/v) ethanol a 9,2% (v/v) kyselinu octovou. Gel byl ponechán v barvicí lázni za stálého míchání po dobu 1 hodiny. Barvicí roztok byl následně vyměněn za odbarvovací lázeň obsahující 25% (v/v) ethanol a 10% (v/v) kyselinu octovou. Odbarvovací lázeň byla vždy po 60 minutách vyměněna. Gel byl dostatečně odbarven přibližně za 4 hodiny při stálém míchání. Odbarvený gel byl naskenován a vyhodnocen v programu ImageJ. Byly odečteny plochy odpovídající fosfo- a defosforylovaným formám studovaných proteinů. Součet těchto ploch byl považován za 100% a odpovídal množství přítomného proteinu ve směsi. Z této úvahy byla kalkulována všechna vyhodnocení.

4. Výsledky

4.1. Modelový senzorový hemový protein YddV

Izolace proteinu YddV v celé jeho délce, tedy obsahující jak senzorovou, tak funkční doménu byla komplikovaná. Získané výtěžky byly velmi nízké a protein rychle precipitoval. Proto byl učiněn pokus izolovat alespoň samostatnou senzorovou doménu. Tento přístup se ukázal být vhodným a samotná senzorová doména proteinu YddV (YDDV-HD) byla úspěšně izolována v dostatečných výtěžcích a tento protein neprecipitoval. Proto byly další pokusy prováděny pouze se senzorovou doménou proteinu YddV, která obsahuje hem a to jak v její přirozené formě (tj. WT) tak s mutanty, kde byl buď leucin 65 nebo tyrosin 43 nahrazen jinou aminokyselinou.

Modelové senzorové hemové proteiny YddV-HD WT, YddV-HD L65G, YddV-HD L65M, YddV-HD L65Q, YddV-HD L65T, YddV-HD Y43A, YddV-HD Y43F, YddV-HD Y43W byly úspěšně exprimovány a izolovány. Pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.5., str. 36) byla stanovena čistota izolovaných proteinů. Tato čistota dosahovala hodnot 90% a výše. Na obrázku 8 je jako příklad zobrazen gel získaný pomocí SDS-PAGE při analýze preparátu YddV-HD WT. Jednotlivé preparáty byly charakterizovány stanovením koncentrace proteinů (viz kapitola 3.3.6., str. 38) a spektrofotometrickou kontrolou jejich saturace hemem. Byly připraveny holoformy daných proteinů.

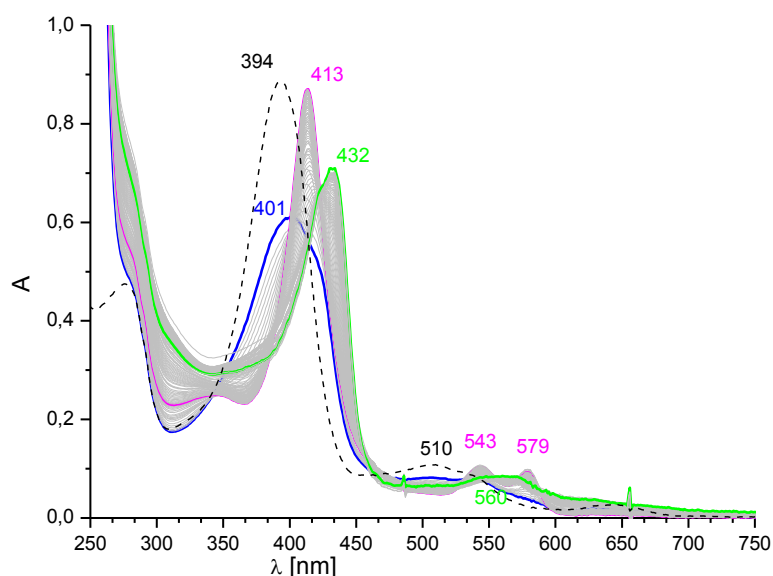


Obrázek 8: Gel získaný pomocí SDS-PAGE při analýze preparátu YddV-HD WT (viz kapitola 3.3.5., str. 36). U vzorků odebraných během izolace YddV-HD proteinu (viz kapitola 3.3.3., str. 33) byla pomocí SDS-PAGE sledována úspěšnost izolačních kroků a nakonec byla ověřena čistota finálního izolovaného proteinu, který byl z 90% homogenní. 1. cytosol, 2. cytosolová frakce nenavázaná na Talon, 3. eluát 200 mM imidazolem, 4. standard: „PageRuler Unstained Broad Range protein ladder č. 26630“

4.1.1. Změny UV-Vis spekter proteinu YddV-HD v jeho přirozené podobě i u mutantů způsobené přidavkem Na₂S

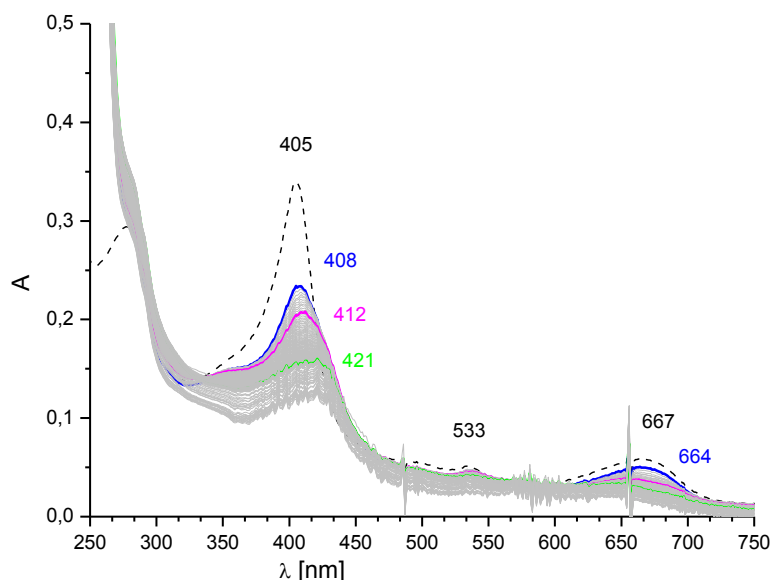
Změny v senzorové doméně způsobené přidavkem Na₂S k YddV-HD byly pozorovány spektrofotometricky. Spektrální analýza proběhla podle postupu, který je blíže popsán v kapitole 3.3.7. (str. 38). Změny UV-Vis spekter proteinů způsobené přidavkem Na₂S jsou zobrazeny na obrázcích 9 až 16 (str. 49).

Změny ve spektru proteinu YddV-HD WT způsobené přidavkem Na₂S jsou zobrazeny na obrázku 9. Vlnová délka Soretova pásu se bezprostředně po přidání Na₂S posunula ze 394 nm na 401 nm. Během dalších 9,5 minut došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 413 nm. 90 minut po přidání Na₂S došlo k výraznému posunutí Soretova pásu až na 432 nm. Zároveň došlo také k posunům pásů ve viditelné oblasti spektra, konkrétně píky při 543 nm a při 579 nm zanikly a nově se zformoval pás při 560 nm.



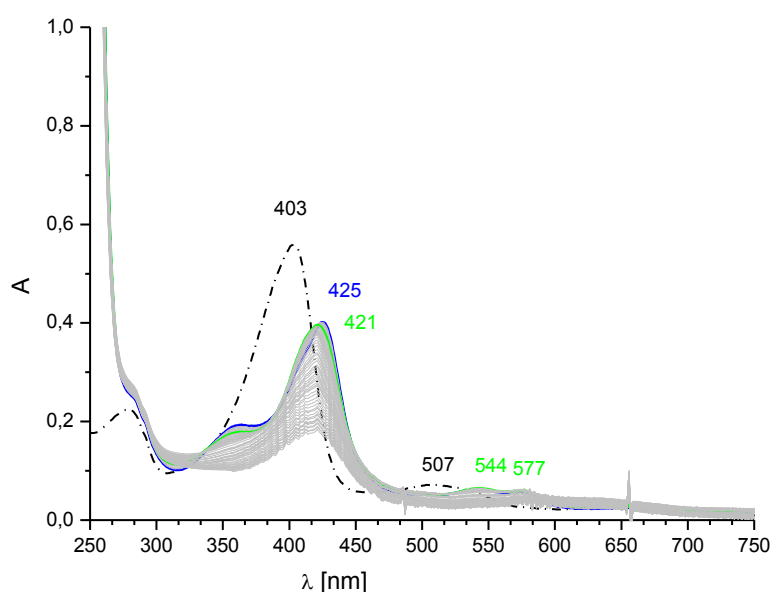
Obrázek 9: Změny spektra proteinu YddV-HD WT způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na₂S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 394 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pás při 510 nm. Po 5 s působení Na₂S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 401 nm (—). Po 9,5 minutách působení Na₂S došlo k posunu vlnové délky maxima na 413 nm. V této době spektrum obsahovalo také pásy při 543 nm a při 579 nm (—). Po 90 minutách došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 432 nm a k vytvoření pásu kolem 560 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektru proteinu YddV-HD L65G způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 10. Vlnová délka Soretova pásu se bezprostředně po přidání Na_2S posunula ze 405 nm na 408 nm. Během 5,5 minut působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 412 nm. 47 minut po přidání Na_2S došlo k výraznému posunutí Soretova pásu až na 421 nm. Základní spektrum YddV-HD L65G se lišilo od spektra YddV-HD WT (viz obrázek 9, str. 42) ve vlnové délce Soretova pásu (394 nm v případě YddV-HD WT a 405 nm v případě YddV-HD L65G). U tohoto proteinu nedošlo k tak výrazné změně vlnové délky maxima ani po dlouhé době inkubace s Na_2S jako tomu bylo v případě YddV-HD WT.



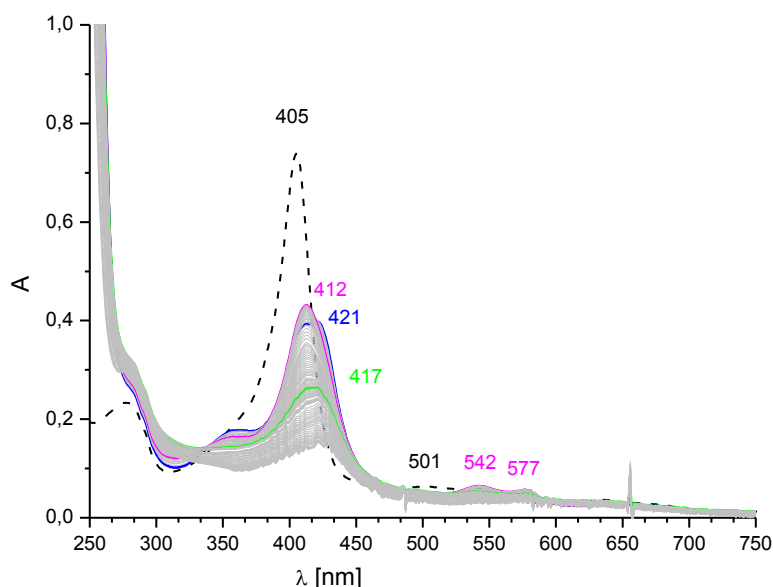
Obrázek 10: **Změny spektra proteinu YddV-HD L65G způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—).** Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 405 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 533 nm a při 667 nm. Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k posunu vlnové délky maxima na 408 nm (—). Po 5,5 minutách působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky maxima na 412 nm (—). Po 47 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 421 (—). Pás kolem 667 nm zůstal přítomen u většiny spekter. Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektru proteinu YddV-HD L65M způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 11. Vlnová délka Soretova pásu se bezprostředně po přidání Na_2S výrazně posunula ze 403 nm na 425 nm. Během 8 minut působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 421 nm. Narozdíl od YddV-HD WT, u tohoto proteinu došlo k dramatickému posunu vlnové délky Soretova pásu ihned po přidání Na_2S a to až na 425 nm.



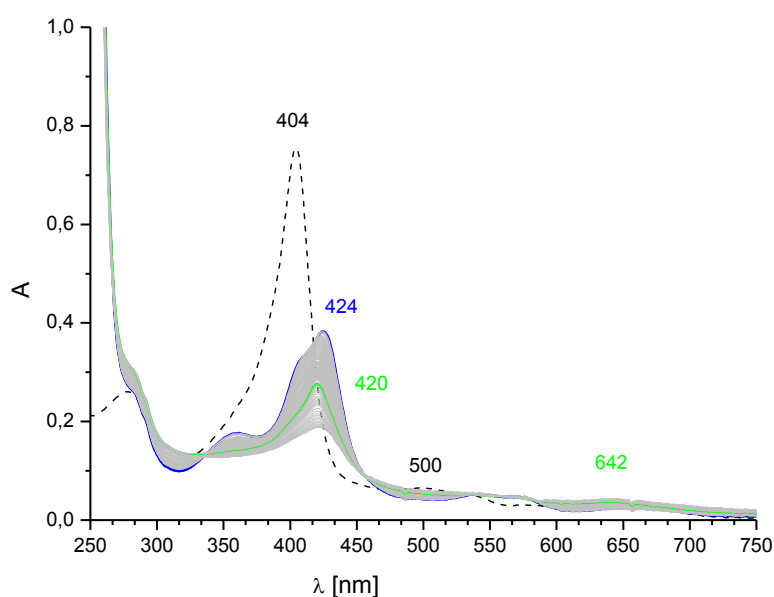
Obrázek 11: Změny spektra proteinu YddV-HD L65M způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 403 nm (- - -). Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 425 nm (—). Po 8 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 421 nm a k vytvoření pásů kolem 544 nm a 577 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektru proteinu YddV-HD L65Q způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 12. Vlnová délka Soretova pásu se bezprostředně po přidání Na_2S výrazně posunula ze 405 nm na 421 nm. Během 4 minut působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 412 nm. Po 44 minutách působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky maxima až na 417 nm.



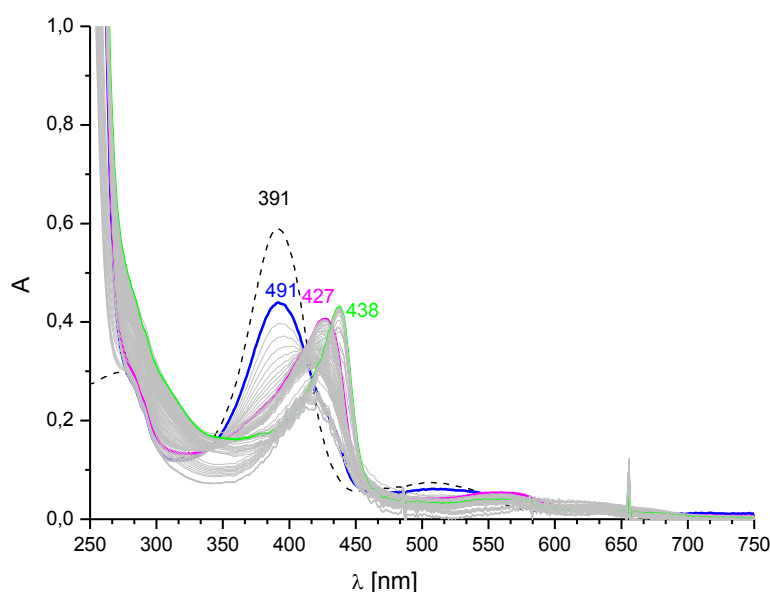
Obrázek 12: Změny spektra proteinu YddV-HD L65Q způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 405 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 501 nm. Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k posunu vlnové délky maxima na 421 nm (—). Po 4 minutách působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky maxima na 412 nm (—). Byly také vytvořeny pásy při 542 nm a při 577 nm. Po 44 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 417 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektru proteinu YddV-HD L65T způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 13. Vlnová délka Soretova pásu se bezprostředně po přidání Na_2S výrazně posunula ze 404 nm na 424 nm. Během 69 minut působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 420 nm. Efekt Na_2S na YddV-HD L65T a speciálně na jeho UV-Vis spektrum je velmi podobný efektu této látky na spektrum YddV-HD L65M (viz obrázek 11, str. 44).



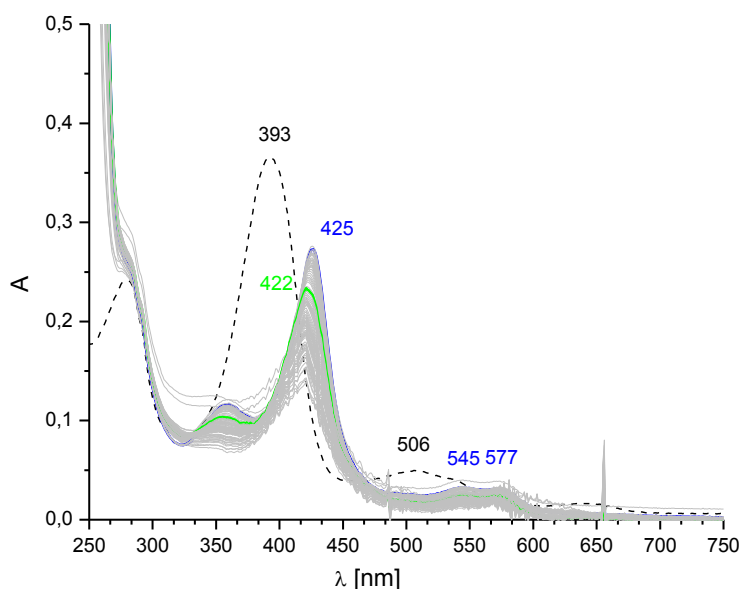
Obrázek 13: Změny spektra proteinu YddV-HD L65T způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 404 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 500 nm. Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 424 nm (—). Po 69 minutách působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 420 nm a k vytvoření pásu kolem 642 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektru proteinu YddV-HD Y43A způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 14. Ihned po přidavku Na_2S nedošlo k výrazné změně vlnové délky maxima. Po 5,5 minutách od přidání Na_2S se vlnová délka Soretova pásu výrazně posunula překvapivě až na 427 nm. Během 110 minut působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu dokonce až na 438 nm. Spektrální změny proteinu YddV-HD Y43A vlivem Na_2S jsou nejvýraznější ze všech studovaných spektrálních změn YddV-HD proteinů ve smyslu iniciace největších posunů vlnových délek charakteristických píků.



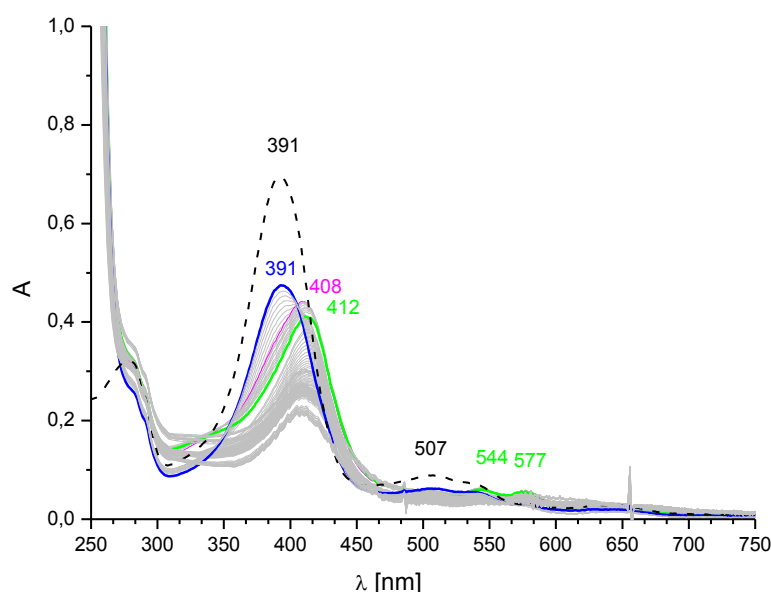
Obrázek 14: Změny spektra proteinu YddV-HD Y43A způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 391 nm (- - -). Bezprostředně po přidání Na_2S nedošlo ke změně vlnové délky maxima (—). Po 5,5 minutách působení Na_2S došlo k výraznému posunu vlnové délky Soretova pásu až na 427 nm (—). Po 110 minutách působení Na_2S se vlnová délka maxima posunula až k 438 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektru proteinu YddV-HD Y43F způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 15. Ihned po přidavku Na_2S došlo k výraznému posunu vlnové délky maxima až na 425 nm. Během 22 minut působení Na_2S došlo ke změně vlnové délky Soretova pásu na 422 nm.



Obrázek 15: Změny spektra proteinu YddV-HD Y43F způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 393 nm (- - -). Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 425 nm (—). Spektrum obsahuje pásy při 545 nm a 577 nm. Po 22 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu na 422 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

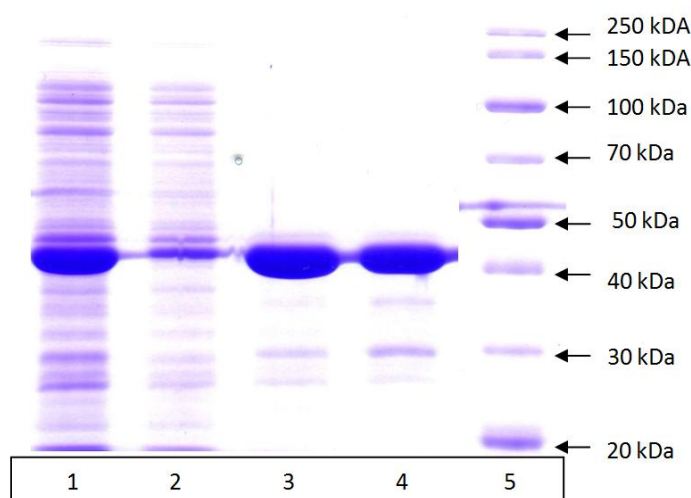
Změny ve spektru proteinu YddV-HD Y43W způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 16. Ihned po přidavku Na_2S nedošlo k výraznému posunu vlnové délky maxima. Během 5 minut působení Na_2S došlo k výraznému posunu vlnové délky maxima až na 408 nm. Po 9,5 minutách působení Na_2S se vlnová délka maxima posunula až na 412 nm. Spektrální změny proteinu YddV-HD Y43W vlivem Na_2S jsou nejméně výrazné v porovnání se všemi studovanými spektrálními změnami YddV-HD proteinů ve smyslu iniciace nejmenších posunů vlnových délek charakteristických píků.



Obrázek 16: Změny spektra proteinu YddV-HD Y43W způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 391 nm (---). Spektrum obsahuje pás při 507 nm. Bezprostředně po přidání Na_2S nedošlo k posunu vlnové délky Soretova pásu (—). Po 5 minutách působení Na_2S došlo k výraznému posunu vlnové délky maxima na 408 nm (—). Na 412 nm se vlnová délka maxima posunula po 9,5 minutách od přidavku Na_2S (—). Také byly vytvořeny pásy při 544 nm a při 577 nm. Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

4.2. Modelový senzorový hemový protein AfGcHK

Modelové senzorové hemové proteiny AfGcHK WT, AfGcHK H99A, AfGcHK L68F, AfGcHK L68G, AfGcHK L68N, AfGcHK L68V, AfGcHK Y45F, AfGcHK Y45L, AfGcHK Y45W byly úspěšně exprimovány a izolovány. Pomocí SDS PAGE (viz kapitola 3.3.5., str 36.) byla stanovena čistota izolovaných proteinů. Na obrázku 17 je na ukázkou zobrazen gel získaný pomocí SDS-PAGE při analýze preparátu AfGcHK WT. Preparát AfGcHK WT byl homogenní z 95%. Jednotlivé preparáty byly charakterizovány stanovením koncentrace proteinů (viz kapitola 3.3.6., str. 38) a spektrofotometrickou kontrolou jejich saturace hemem. Byly připraveny holoformy daných proteinů.

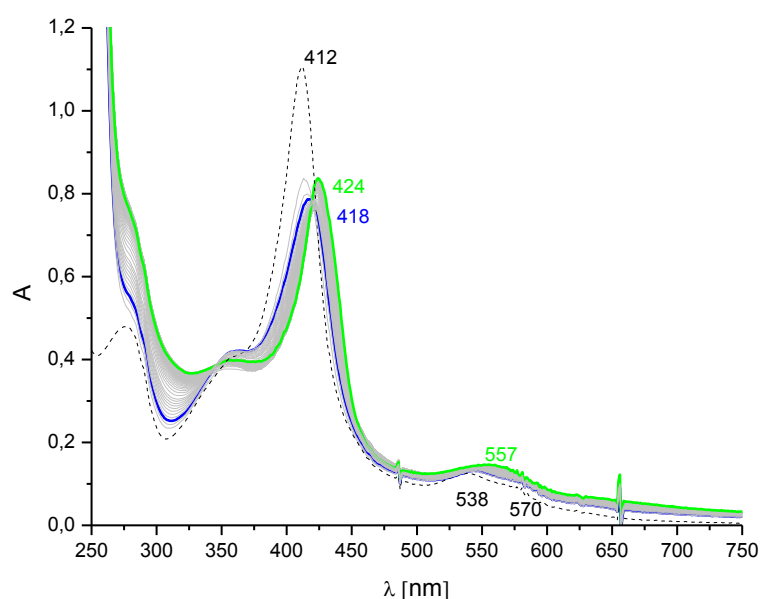


Obrázek 17: Gel získaný pomocí SDS-PAGE při analýze preparátů obsahujících AfGcHK WT (viz kapitola 3.3.5., str. 36). U vzorků odebraných během izolace proteinu AfGcHK WT (viz kapitola 3.3.3., str. 33) byla pomocí SDS- PAGE sledována úspěšnost izolačních kroků a nakonec byla ověřena čistota finálního izolovaného proteinu, který byl z 95% homogenní. 1. cytosol , 2. cytosolová frakce nenavázaná na Talon, 3. eluát 200 mM imidazolem, 4. eluát 200 mM imidazolem po koncentraci, 5. standard: „PageRuler Unstained Broad Range protein ladder č. 26630“

4.2.1. Změny UV-Vis spekter proteinu AfGcHK způsobené přidavkem Na₂S

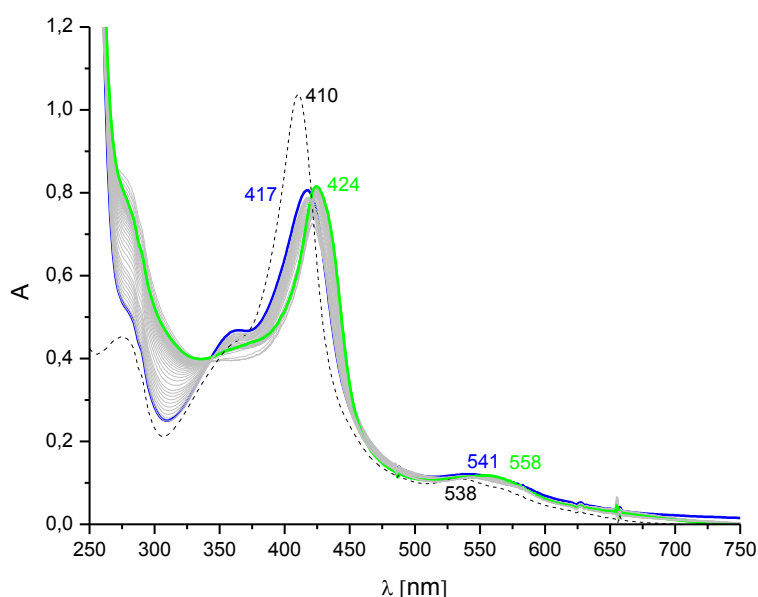
Změny v senzorové doméně resp. v bezprostředním okolí hemu způsobené přidavkem Na₂S k AfGcHK byly pozorovány spektrofotometricky. Spektrální analýza proběhla podle postupu, který je blíže popsán v kapitole 3.3.7. (str. 38). Změny UV-Vis spekter proteinů způsobené přidavkem Na₂S jsou zobrazeny na obrázcích 18 (str. 51) až 25 (str. 58).

Změny ve spektru AfGcHK WT proteinu způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 18. Vlnová délka Soretova pásu se během 75 s posunula ze 412 nm k 418 nm. Během dalších 75 minut došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu až k 424 nm. Za tuto dobu došlo také ke změnám vlnových délek pásů ve viditelné oblasti spektra, konkrétně původní pásy při 538 nm a při 570 nm byly nahrazeny pásem s maximem při 557 nm.



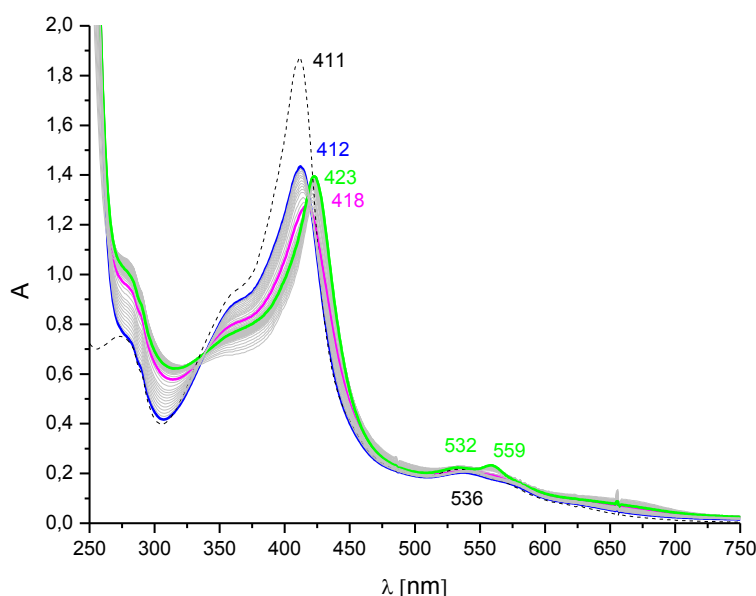
Obrázek 18: **Změny spektra proteinu AfGcHK WT způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—).** Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 412 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 538 nm a při 570 nm. Po 75 s působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 418 nm (—). Po 75 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 424 nm a k vytvoření pásu kolem 557 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny ve spektrech proteinu *AfGcHK L68F* způsobené přidavkem Na_2S jsou zobrazeny na obrázku 19. Vlnová délka Soretova pásu se během 15 s působení Na_2S posunula ze 410 nm na 417 nm. Během dalších 53 minut působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu až na 424 nm. Zároveň došlo také k posunům pásů ve viditelné oblasti, konkrétně došlo k posunutí vlnové délky pásu při 538 nm na 558 nm. Vliv Na_2S na spektra *AfGcHK WT* (viz obrázek 18, str. 51) a *AfGcHK L68F* byl velmi podobný.



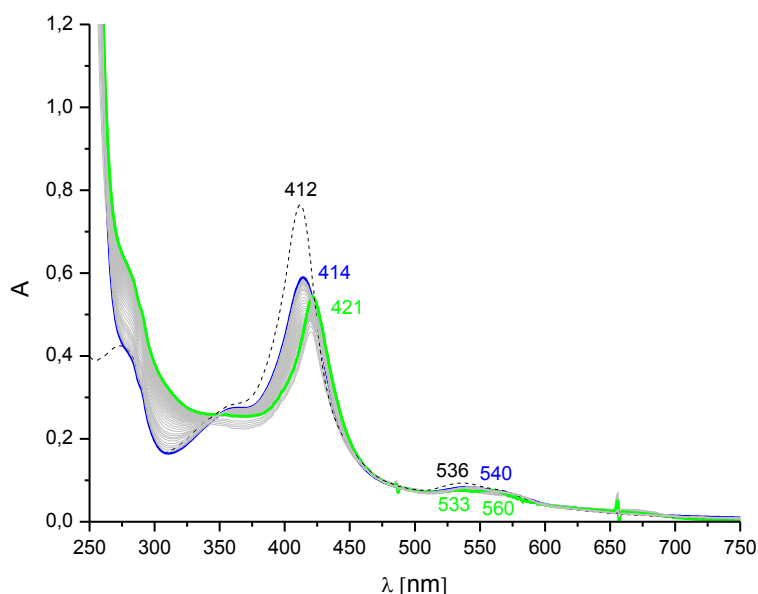
Obrázek 19: **Změny spektra proteinu *AfGcHK L68F* způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—).** Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 410 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pás při 538 nm. Po 15 s působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 417 nm a k vytvoření pásu při 541 nm (—). Po 53 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 424 nm a k vytvoření pásu kolem 558 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny spektra proteinu AfGcHK L68G způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek jsou zobrazeny na obrázku 20. Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k jen k nepatrnému posunutí vlnové délky Soretova pásu ze 411 nm na 412 nm. K hodnotě 418 nm se Soretův pás posunul po 8 minutách působení Na_2S . Po 23 minutách došlo k posunutí vlnové délky Soretova pásu až na 423 nm. Behem této doby došlo také k manifestaci dvou pásů při 532 nm a 559 nm náhradou za pás při 536 nm. Spektrální změny vyvolané Na_2S v případě AfGcHK L68G se liší od spektrálních změn AfGcHK WT (viz obrázek 18, str. 51) hlavně v delším čase nezbytném pro posun Soretova píku ze 411 nm k 418 nm. V případě AfGcHK WT došlo k vytvoření tohoto pásu po 15 s působení Na_2S , u AfGcHK L68G až po 8 minutách působení Na_2S .



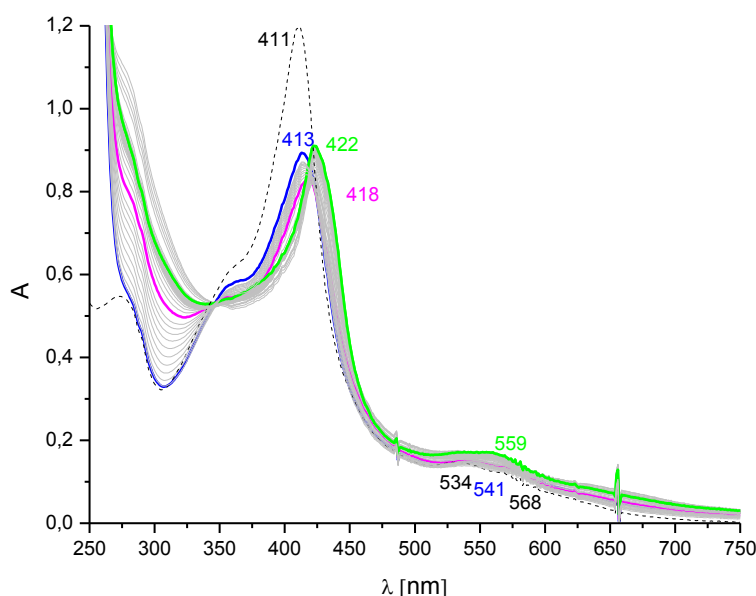
Obrázek 20: Změny spektra proteinu AfGcHK L68G způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 411 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pás při 536 nm. Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k jen k nepatrnému posunutí vlnové délky Soretova pásu na 412 nm (—). K 418 nm se Soretův pás posunul po 8 minutách působení Na_2S (—). Po 23 minutách došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 423 nm a k vytvoření pásů kolem 532 nm a 559 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny spektra proteinu AfGcHK L68N způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek jsou zobrazeny na obrázku 21. Bezprostředně po přidání Na₂S došlo k nepatrnému posunutí vlnové délky Soretova pásu ze 412 nm na 414 nm. Po 59 minutách působení Na₂S došlo k další změně vlnové délky Soretova pásu až na 421 nm. Zároveň došlo také k posunům pásů ve viditelné oblasti spektra. Konkrétně zánik pásu při 536 nm a byly zformovány nové pásy při 533 nm a 560 nm. Spektrální změny proteinu AfGcHK L68N vyvolané přidavkem Na₂S jsou podobné analogickým spektrálním změnám AfGcHK L68G (viz obrázek 20, str. 53) a oproti situaci s AfGcHK WT (viz obrázek 18, str. 51) nedošlo k tak výraznému posunu vlnové délky Soretova pásu.



Obrázek 21: Změny spektra proteinu AfGcHK L68N způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na₂S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 412 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pás při 536 nm. Po 15 s působení Na₂S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 414 nm a k vytvoření pásu při 540 nm (—). Po 59 minutách působení Na₂S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 421 nm a k vytvoření pásů kolem 533 nm a 560 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

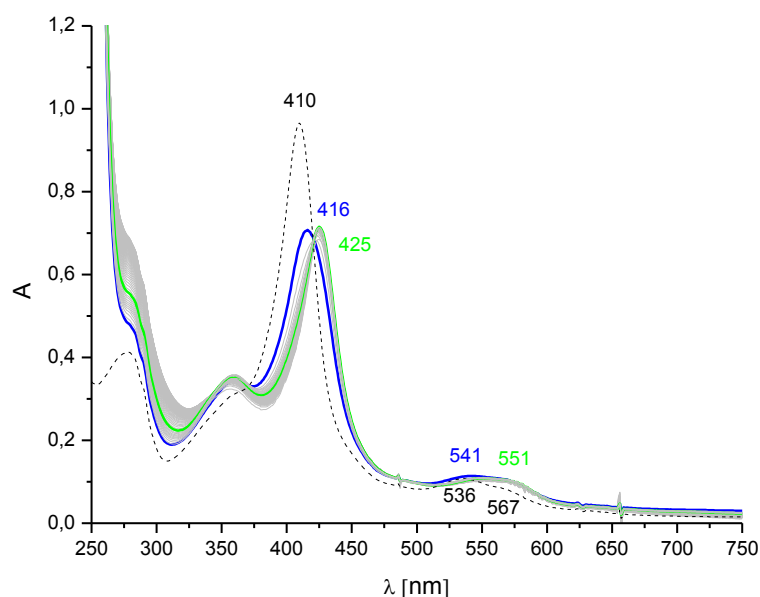
Změny spektra proteinu AfGcHK L68V způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek jsou zobrazeny na obrázku 22. Bezprostředně po přidání Na₂S došlo k nepatrnému posunutí vlnové délky Soretova pásu ze 411 nm na 413 nm. K 418 nm se Soretův pás posunul po 6 minutách působení Na₂S. Po 51 minutách působení Na₂S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 422 nm. Během této doby došlo také k zániku pásů při 534 nm a 568 nm a formaci nového pásu při 559 nm. Tyto spektrální změny vyvolané Na₂S se od spektrálních změn AfGcHK WT (viz obrázek 18, str. 51) liší hlavně v době nezbytné pro posun Soretova pásu ze 411 nmk 418 nm. V případě AfGcHK WT došlo k tomuto posunu Soretova pásu již za 75 s, v případě AfGcHK L68V bylo pro takový posun ve vlnové délce Soretova pásu nutné, aby Na₂S působil 6 minut.



Obrázek 22: Změny spektra proteinu AfGcHK L68V způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na₂S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 411 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 534 nm a při 568 nm. Bezprostředně po přidání Na₂S došlo k nepatrnému posunutí vlnové délky Soretova pásu na 413 nm (—). Na 418 nm se Soretův pás posunul po 6 minutách působení Na₂S (—). Po 51 minutách působení Na₂S došlo k další změně vlnové délky Soretova pásu až na 422 nm a k vytvoření pásu kolem 559 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

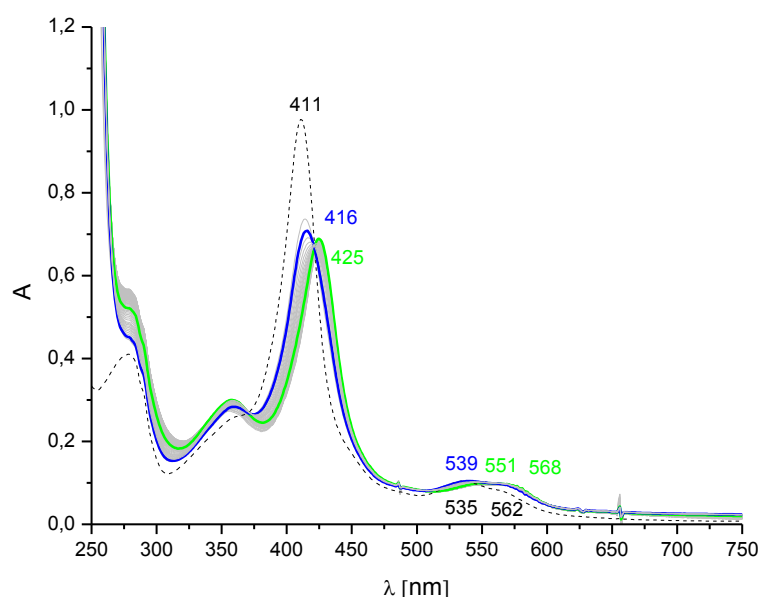
V případě AfGcHK s mutovaným tyrosinem v pozici 45 došlo k posunům vlnových délek Soretova pásu působením Na₂S rychleji (viz obrázky 23 až 25, str. 58), než v případě proteinů AfGcHK WT a mutantů leucinu v pozici 68 (viz obrázky 18, str. 51 až 22, str. 55). Tato změna proběhla u všech tyrosinových mutantů v rámci jednotek minut.

Změny spektra proteinu AfGcHK Y45F způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek jsou zobrazeny na obrázku 23. Bezprostředně po přidání Na₂S došlo k výraznému posunu vlnové délky Soretova pásu ze 410 nm k 416 nm. Již po 5 minutách působení Na₂S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 425 nm. Během této doby došlo také k zániku pásů při 536 nm a 567 nm za současné formace pásu při 551 nm. Spektrální změny AfGcHK Y45F jsou oproti spektrálním změnám AfGcHK WT (viz obrázek, 18 str. 51) daleko rychlejší a výraznější.



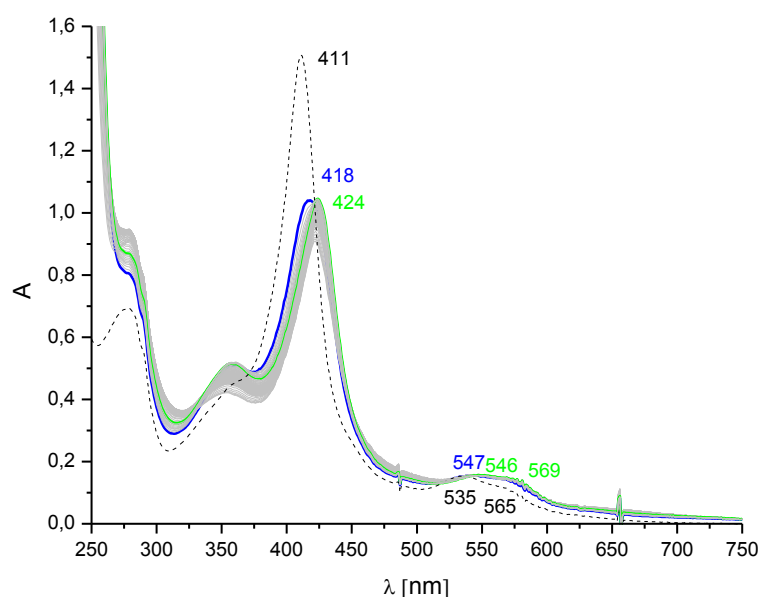
Obrázek 23: **Změny spektra proteinu AfGcHK Y45F způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek (—).** Reakční směs obsahovala Na₂S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 410 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 536 nm a při 567 nm. Po 15 s působení Na₂S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 416 nm a k vytvoření pásu při 541 nm (—). Po 6 minutách působení Na₂S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 425 nm a k vytvoření pásu kolem 551 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny spektra proteinu AfGcHK Y45L způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek jsou zobrazeny na obrázku 24. 45 s po přidání Na₂S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu ze 411 nm na 416 nm. Po 14 minutách působení Na₂S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 425 nm. Během této doby došlo také k zániku pásů při 535 nm a 562 nm za formace dvou pásů při 551 nm a 568 nm. Spektrální změny AfGcHK Y45L, stejně jako AfGcHK Y45F vyvolané Na₂S jsou oproti spektrálním změnám AfGcHK WT (viz obrázek 18, str. 51) rychlejší a výraznější.



Obrázek 24: **Změny spektra proteinu AfGcHK Y45L způsobené přidavkem Na₂S za aerobních podmínek (—).** Reakční směs obsahovala Na₂S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 411 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 535 nm a při 562 nm. Po 45 s působení Na₂S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 416 nm a k vytvoření pásu při 539 nm (—). Po 14 minutách působení Na₂S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 425 nm a k vytvoření pásů kolem 551 nm a 568 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

Změny spektra proteinu *AfGcHK* Y45W způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek jsou zobrazeny na obrázku 25. Bezprostředně po přidání Na_2S došlo k výraznému posunu vlnové délky Soretova pásu ze 411 nm na 418 nm. Již po 6 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 424 nm. Během této doby došlo také k zániku pásů při 535 nm a 565 nm za formace dvou nových pásů při 546 nm a 569 nm. Spektrální změny *AfGcHK* Y45W, stejně jako spektrální změny dalších tyrosinových mutantů *AfGcHK* vyvolané Na_2S jsou oproti spektrálním změnám *AfGcHK* WT (viz obrázek 18, str. 51) rychlejší a výraznější.



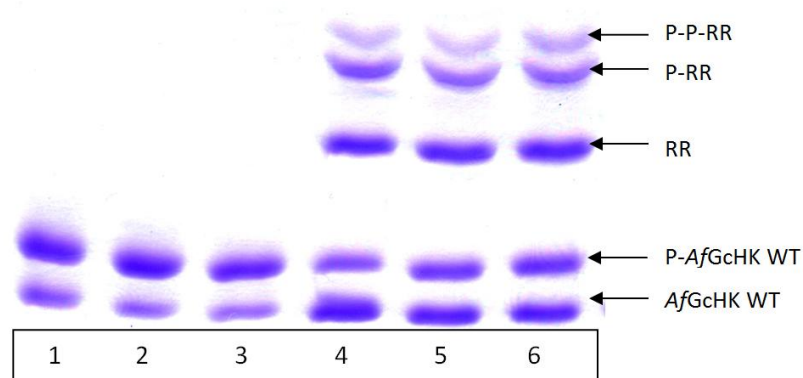
Obrázek 25: Změny spektra proteinu *AfGcHK* Y45W způsobené přidavkem Na_2S za aerobních podmínek (—). Reakční směs obsahovala Na_2S v tisícinásobném koncentračním nadbytku vůči koncentraci proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38). V čase 0 s bylo zaznamenáno základní spektrum proteinu s vlnovou délkou Soretova pásu při 411 nm (- - -). Spektrum také obsahuje pásy při 535 nm a při 565 nm. Po 15 s působení Na_2S došlo k posunu vlnové délky Soretova pásu na 418 nm a k vytvoření pásu při 547 nm (—). Po 5 minutách působení Na_2S došlo k dalšímu posunu vlnové délky Soretova pásu až na 424 nm a k vytvoření pásů kolem 546 nm a 569 nm (—). Čísla uvedená nad absorpčními maximy křivek označují vlnovou délku daného maxima v nm.

4.2.2. Změna enzymové aktivity proteinu *AfGcHK* v jeho přirozené formě i u mutantů způsobená přidavkem Na_2S

Phos-tag činidlo způsobuje, že fosforylovaný protein prochází gelem při jeho elektorforetické separaci pomaleji než nefosforylovaný protein. Tento princip pak umožňuje určit množství fosfo- a defosfo-formy proteinu v inkubační směsi, která obsahuje enzym s fosforylační aktivitou [85]. V této práci byla takto analyzována autofosforylační aktivita *AfGcHK* proteinu (viz kapitola 3.3.7., str. 38).

AfGcHK je fosforylován na H183 (P-*AfGcHK*) [36]. RR protein může být fosforylován na D52 (P-RR) nebo D169 nebo dvojitě fosforylován na D52 i na D169 (P-P-RR) [36]. Je zajímavé, že na phos-tag SDS-PAGE byl u všech analyzovaných inkubačních směsí obsahujících *AfGcHK* a RR protein identifikován RR s dvojitou fosforylací a RR s fosforylací na D52, nebyla však nikdy zaznamenána přítomnost RR s fosforylací na D169. Doba pre-inkubace jednotlivých mutantů *AfGcHK* s Na_2S (viz kapitola 3.3.7., str. 38) byla odvozena ze změn ve spektrech jednotlivých proteinů ovlivněných Na_2S (viz kapitola 4.2.1., str. 50). Doba vlastní analýzy enzymové aktivity *AfGcHK* resp. její funkční domény po působení Na_2S byla vždy stejná (tj. 1 minuta) (viz kapitola 3.3.7., str. 38).

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity *AfGcHK* WT ovlivněnou přidavkem Na_2S je zobrazen na obrázku 26 (str. 60). Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci *AfGcHK* WT proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na_2S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na_2S . Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na_2S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na_2S po dobu 75 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na_2S 75 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 26: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK WT ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK WT. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 75 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 75 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK WT ovlivněnou přidavkem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena (viz kapitola 3.3.8., str. 38). Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK WT jsou zobrazeny v tabulce 2, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 3 (str. 61). Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK. V případě experimentu bez přítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu kinasové aktivity AfGcHK WT. Pokud byl v reakční směsi přítomen RR protein, došlo k výraznějšímu nárůstu v kinasové aktivitě AfGcHK WT účinkem Na₂S a zároveň došlo k mírnému poklesu efektivity fosforylace RR proteinu. Nicméně pokles efektivity fosforylace RR proteinu byl výrazně menší než nárůst autokinasové aktivity AfGcHK WT.

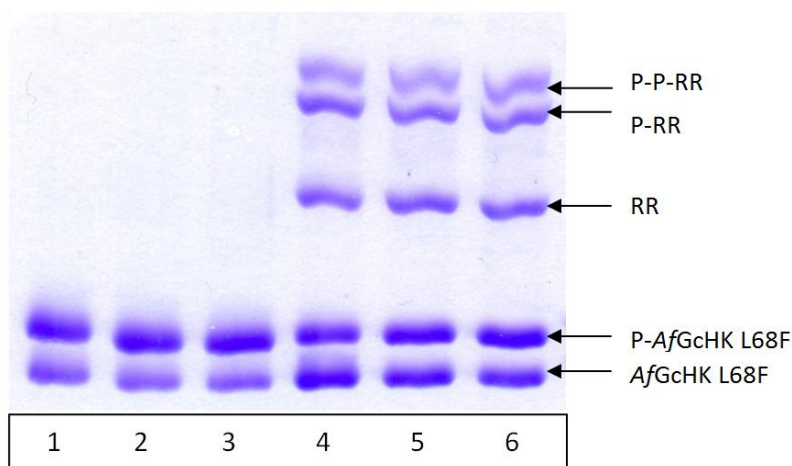
Tabulka 2: Průměrné hodnoty týkající vlivu Na₂S se autofosforylační aktivitu AfGcHK WT.

| WT | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0 s | 66,0 ± 2,2 | 8,3 ± 0,3 | |
| | 75 s | 71,0 ± 0,8 | 8,9 ± 0,1 | 7,7 ± 4,0 |
| | 75 min | 67,3 ± 3,3 | 8,4 ± 0,4 | 2,0 ± 2,8 |
| AfGcHK + RR | 0 s | 40,0 ± 3,7 | 5,0 ± 0,5 | |
| | 75 s | 54,7 ± 5,8 | 6,8 ± 0,7 | 36,8 ± 9,0 |
| | 75 min | 56,3 ± 4,9 | 7,0 ± 0,4 | 41,2 ± 8,9 |

Tabulka 3: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK WT.

| | dobu pre-inkubace s Na ₂ S | % P-P-RR | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % P-RR | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| P-transfer RR | 0s | 15,0 ± 1,6 | 1,5 ± 0,2 | 35,3 ± 2,5 | 3,6 ± 0,3 | |
| | 75s | 15,0 ± 2,9 | 1,5 ± 0,3 | 31,0 ± 1,6 | 3,1 ± 0,2 | -8,6 ± 0,4 |
| | 75 min | 17,0 ± 3,7 | 1,7 ± 0,4 | 29,3 ± 2,1 | 3,0 ± 0,2 | -8,1 ± 5,3 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68F ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 27. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68F proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 53 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 27: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68F ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68F. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 53 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68F ovlivněnou přidavkem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena (viz kapitola 3.3.8., str. 38). Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68F jsou zobrazeny v tabulce 4, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR jsou zobrazeny v tabulce 5. Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68F. V případě experimentu bez přítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu kinasové aktivity AfGcHK L68F. Pokud byl v reakční směsi přítomen RR protein, došlo k výraznějšímu nárůstu v kinasové aktivitě AfGcHK L68F účinkem Na₂S a zároveň došlo k mírnému poklesu efektivity fosforylace RR proteinu. Nicméně pokles efektivity fosforylace RR proteinu byl výrazně (několikanásobně) menší než nárůst autokinasové aktivity AfGcHK L68F. Získaná data ohledně vlivu Na₂S na enzymové aktivity AfGcHK WT a AfGcHK L68F byla velmi podobná.

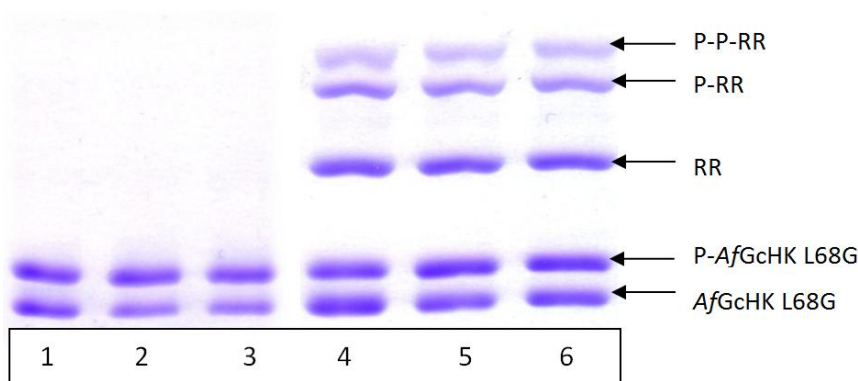
Tabulka 4: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivity AfGcHK L68F.

| L68F | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 60,0 ± 1,4 | 7,5 ± 0,2 | |
| | 15s | 65,0 ± 1,4 | 8,1 ± 0,2 | 8,4 ± 2,5 |
| | 53 min | 65,7 ± 1,7 | 8,2 ± 0,2 | 9,5 ± 4,3 |
| AfGcHK + RR | 0s | 43,7 ± 3,4 | 5,5 ± 0,4 | |
| | 15s | 58,0 ± 4,9 | 7,3 ± 0,6 | 33,5 ± 13,7 |
| | 53 min | 58,0 ± 5,1 | 7,3 ± 0,6 | 32,9 ± 6,0 |

Tabulka 5: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK L68F.

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojtě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| P-transfer RR | 0s | 22,0 ± 4,5 | 2,2 ± 0,5 | 34,0 ± 2,9 | 3,4 ± 0,3 | |
| | 15s | 23,7 ± 3,9 | 2,4 ± 0,4 | 30,7 ± 1,9 | 3,1 ± 0,2 | -2,9 ± 0,7 |
| | 53 min | 23,7 ± 5,3 | 2,4 ± 0,5 | 30,7 ± 1,2 | 3,1 ± 0,1 | -2,9 ± 6,2 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68G ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 28. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68G proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 8 minut a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 23 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 28: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68G ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68G. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 8 min a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 23 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68G ovlivněnou přidavkem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena (viz kapitola 3.3.8., str. 38). Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68G jsou zobrazeny v tabulce 6 (str. 64), hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 7 (str. 64). Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68G. V případě experimentu bez přítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu kinasové aktivity AfGcHK L68G. Pokud byl v reakční směsi přítomen RR protein, došlo k výraznějšímu nárůstu v kinasové aktivitě AfGcHK L68G účinkem Na₂S a zároveň došlo k mírnému poklesu efektivity fosforylace RR. Nicméně pokles efektivity fosforylace RR

proteinu byl výrazně (několikanásobně) menší než nárůst autokinasové aktivity AfGcHK L68G. Aktivace kinasové aktivity AfGcHK L68G vlivem Na₂S v přítomnosti RR proteinu nebyla tak značná jako v případě AfGcHK WT nebo AfGcHK L68F.

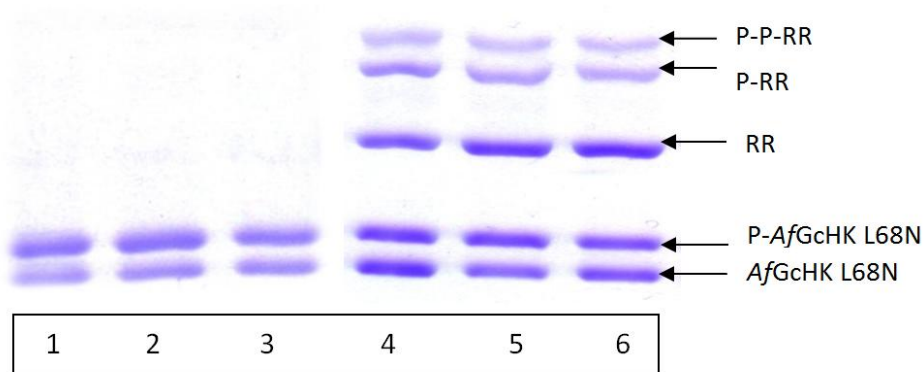
Tabulka 6: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivity AfGcHK L68G.**

| L68G | dobu pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 55,0 ± 2,8 | 6,9 ± 0,4 | |
| | 8 min | 60,3 ± 1,2 | 7,5 ± 0,2 | 9,9 ± 4,3 |
| | 23 min | 57,3 ± 3,7 | 7,2 ± 0,5 | 4,5 ± 8,2 |
| AfGcHK + RR | 0s | 44,7 ± 2,1 | 5,6 ± 0,3 | |
| | 8 min | 53,7 ± 0,9 | 6,7 ± 0,1 | 20,3 ± 4,2 |
| | 23 min | 51,0 ± 2,2 | 6,4 ± 0,3 | 14,2 ± 1,1 |

Tabulka 7: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK L68G.**

| | dobu pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojitě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| P-transfer RR | 0 s | 17,3 ± 2,6 | 1,8 ± 0,3 | 32,7 ± 1,9 | 3,3 ± 0,2 | |
| | 8 min | 18,0 ± 1,4 | 1,8 ± 0,1 | 30,3 ± 1,7 | 3,1 ± 0,2 | -3,3 ± 5,2 |
| | 23 min | 19,0 ± 0,8 | 1,9 ± 0,1 | 30,3 ± 1,2 | 3,1 ± 0,1 | -1,3 ± 3,8 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68N ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 29 (str. 65). Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68N proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 59 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 29: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68N ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68N. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 59 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68N ovlivněnou přidavkem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena (viz kapitola 3.3.8., str. 38). Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68N jsou zobrazeny v tabulce 8, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 9 (str. 66). Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68N. Nárůst v kinasové aktivitě AfGcHK L68N vlivem Na₂S byl srovnatelný jak v případě přítomnosti RR proteinu, tak v případě absence RR proteinu. Vliv Na₂S na enzymovou aktivitu AfGcHK L68N byl nejméně výrazný v porovnání se všemi testovanými proteiny a zároveň došlo vlivem Na₂S k nejvýraznější inhibici fosforylace RR proteinu a to o 21,3 %.

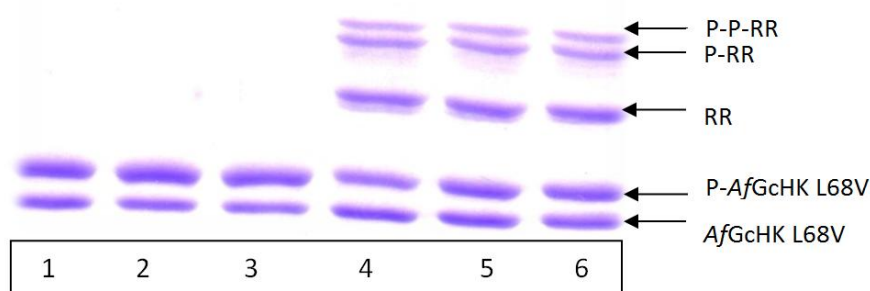
Tabulka 8: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivity AfGcHK L68N.

| L68N | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 56,3 ± 0,9 | 7,0 ± 0,1 | |
| | 15 s | 62,0 ± 1,6 | 7,8 ± 0,2 | 10,1 ± 3,4 |
| | 59 min | 56,7 ± 0,9 | 7,1 ± 0,1 | 0,6 ± 1,7 |
| AfGcHK + RR | 0s | 45,3 ± 4,0 | 5,7 ± 0,5 | |
| | 15 s | 52,3 ± 3,3 | 6,5 ± 0,4 | 15,7 ± 6,9 |
| | 59 min | 48,3 ± 2,0 | 6,0 ± 0,3 | 7,4 ± 9,4 |

Tabulka 9: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK L68N.

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojtě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| P-transfer RR | 0s | 22,5 ± 4,9 | 2,3 ± 0,5 | 33,5 ± 1,7 | 3,4 ± 0,2 | |
| | 15 s | 21,5 ± 4,4 | 2,2 ± 0,4 | 29,5 ± 3,0 | 3,0 ± 0,3 | -9,2 ± 6,1 |
| | 59 min | 18,3 ± 4,5 | 1,8 ± 0,5 | 26,0 ± 3,2 | 2,6 ± 0,3 | -21,3 ± 4,0 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68V ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 30. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68V proteinu. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68V. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 6 min a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 51 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 30: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68V ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68V. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 6 min a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 51 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68V byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68V jsou zobrazeny v tabulce 10, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 11. Experiment byl zopakován třikrát. Aktivace kinasové aktivity AfGcHK L68V proteinu vlivem Na₂S byla srovnatelná jak v případě přítomnosti RR proteinu, tak v případě absence RR proteinu. V porovnání s aktivací enzymové aktivity AfGcHK WT se však jedná o minoritní nárůst enzymové aktivity AfGcHK L68V vlivem Na₂S.

Tabulka 10: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivitu AfGcHK L68V.**

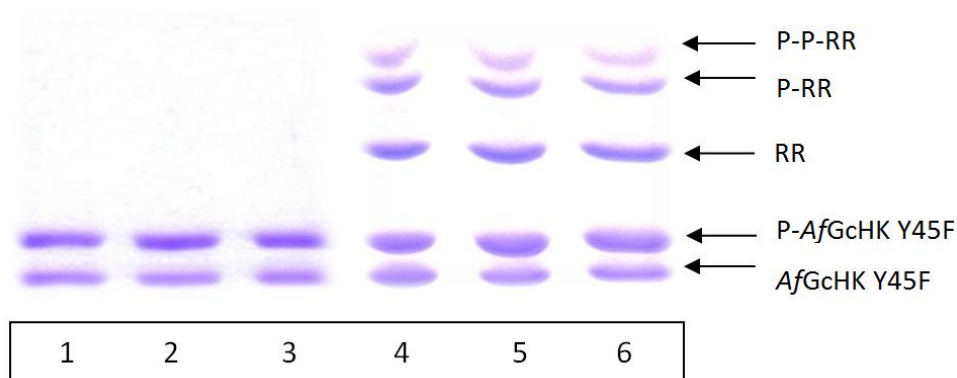
| L68V | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 59,0 ± 2,8 | 7,4 ± 0,3 | |
| | 6 min | 67,2 ± 4,7 | 8,4 ± 0,6 | 14,1 ± 9,1 |
| | 51 min | 66,2 ± 2,9 | 8,3 ± 0,4 | 12,4 ± 6,4 |
| AfGcHK + RR | 0s | 44,8 ± 8,3 | 5,6 ± 1,0 | |
| | 6 min | 50,3 ± 6,3 | 6,3 ± 0,8 | 13,4 ± 6,2 |
| | 51 min | 51,8 ± 8,4 | 6,5 ± 1,1 | 16 ± 10,4 |

Tabulka 11: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK L68V.**

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojité fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| P-transfer RR | 0s | 16,5 ± 7,7 | 1,7 ± 0,8 | 28,8 ± 5,6 | 2,9 ± 0,6 | |
| | 6 min | 15,0 ± 5,4 | 1,5 ± 0,5 | 25,8 ± 5,4 | 2,6 ± 0,5 | -8,0 ± 15,1 |
| | 51 min | 17,0 ± 3,7 | 1,7 ± 0,4 | 26,5 ± 6,2 | 2,7 ± 0,6 | -1,0 ± 15,9 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45F ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 31 (str. 68). Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK Y45F proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 6 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR

protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 31: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45F ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK Y45F. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 6 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45F ovlivněnou přidavkem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45F jsou zobrazeny v tabulce 12 (str. 69), hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 13 (str. 69). Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45F. V případě experimentu bez přítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu kinasové aktivity AfGcHK Y45F vlivem Na₂S. Pokud byl v reakční směsi přítomen RR protein, došlo k výraznějšímu nárůstu v kinasové aktivitě AfGcHK Y45F (až 25%) a zároveň došlo k mírnému poklesu efektivity fosforylace RR proteinu. Aktivace kinasové aktivity AfGcHK Y45F v přítomnosti RR proteinu však nebyla tak značná jako v případě AfGcHK WT nebo AfGcHK L68F.

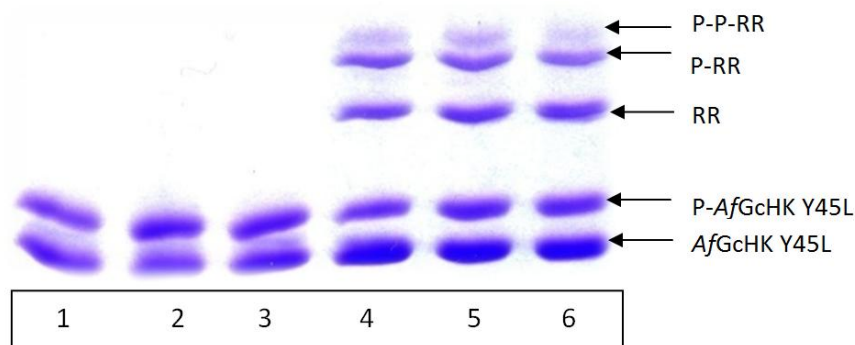
Tabulka 12: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45F.**

| Y45F | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 52,0 ± 1,4 | 6,5 ± 0,2 | |
| | 15 s | 56,0 ± 3,6 | 7,0 ± 0,4 | 7,6 ± 3,9 |
| | 6 min | 56,3 ± 4,2 | 7,0 ± 0,5 | 8,2 ± 5,3 |
| AfGcHK + RR | 0s | 38,3 ± 7,8 | 4,8 ± 1,0 | |
| | 15 s | 48,0 ± 8,6 | 6,0 ± 1,1 | 25,9 ± 8,3 |
| | 6 min | 47,7 ± 10,3 | 6,0 ± 1,3 | 23,9 ± 5,9 |

Tabulka 13: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK Y45F.**

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojitě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol/min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| P-transfer RR | 0s | 16,0 ± 1 | 1,6 ± 0,1 | 36,7 ± 2,4 | 3,7 ± 0,2 | |
| | 15 s | 18,5 ± 3,5 | 1,9 ± 0,4 | 34,3 ± 4,0 | 3,5 ± 0,4 | -1,2 ± 8,0 |
| | 6 min | 14,5 ± 1,5 | 1,5 ± 0,2 | 34,7 ± 3,1 | 3,5 ± 0,3 | -6,0 ± 5,3 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45L ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 32 (str. 70). Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK Y45L proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 45 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 14 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 32: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45L ovlivněnou přidávkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK Y45L. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 45 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 14 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45L vlivem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45L jsou zobrazeny v tabulce 14, hodnoty týkající vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 15 (str. 71). Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45L. V případě experimentu bez přítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu kinasové aktivity AfGcHK Y45L účinkem Na₂S. Pokud byl v reakční směsi přítomen RR protein, došlo k výraznějšímu nárůstu v kinasové aktivitě AfGcHK Y45L a zároveň došlo k mírnému poklesu efektivity fosforylace RR proteinu. Aktivace kinasové aktivity AfGcHK Y45L vlivem Na₂S v přítomnosti RR proteinu nebyla tak značná jako v případě AfGcHK WT nebo AfGcHK L68F.

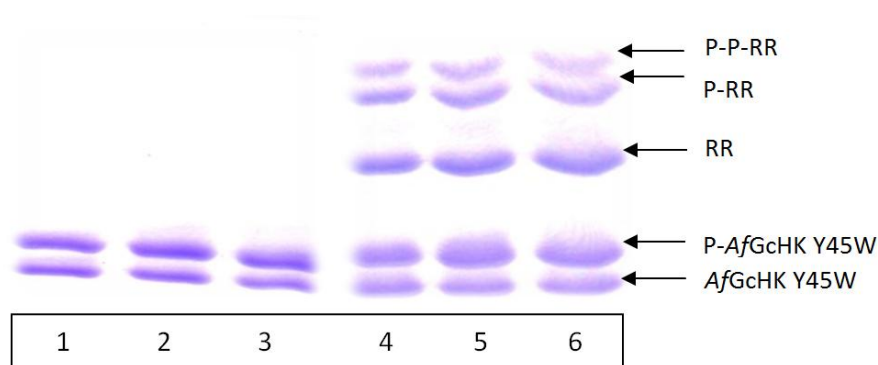
Tabulka 14: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45L.

| Y45L | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 52,3 ± 7,0 | 6,5 ± 0,9 | |
| | 45s | 57,3 ± 6,5 | 7,2 ± 0,8 | 9,9 ± 2,9 |
| | 14 min | 57,0 ± 5,7 | 7,1 ± 0,7 | 9,5 ± 4,8 |
| AfGcHK + RR | 0s | 42,0 ± 5,9 | 5,3 ± 0,7 | |
| | 45s | 49,3 ± 5,9 | 6,2 ± 0,7 | 17,9 ± 5,4 |
| | 14 min | 50,7 ± 7,9 | 6,3 ± 1,0 | 20,7 ± 9,9 |

Tabulka 15: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu na RR v přítomnosti AfGcHK Y45L.

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojtě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| P-transfer RR | 0s | 20,3 ± 3,9 | 2,1 ± 0,4 | 39,0 ± 3,7 | 3,9 ± 0,4 | |
| | 45 s | 22,0 ± 3,3 | 2,2 ± 0,3 | 33,0 ± 2,2 | 3,3 ± 0,2 | -7,1 ± 3,8 |
| | 14 min | 19,7 ± 6,6 | 2,0 ± 0,7 | 30,3 ± 4,5 | 3,1 ± 0,5 | -15,5 ± 4,6 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45W ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 33. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK Y45W proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 5 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 33: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45W ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK Y45W. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 5 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45W ovlivněnou Na₂S byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45W jsou zobrazeny v tabulce 16, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR jsou zobrazeny v tabulce 17. Experiment byl zopakován třikrát. Vždy byl pozorován stimulační vliv Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHKY45W. V případě experimentu bez přítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu kinasové aktivity AfGcHK Y45W vlivem Na₂S. Pokud byl v reakční směsi přítomen RR protein, došlo k výraznějšímu nárůstu kinasové aktivity AfGcHK Y45W (až 34%) a zároveň došlo k mírnému poklesu efektivity fosforylace RR vlivem Na₂S. Aktivace kinasové aktivity AfGcHK Y45W v přítomnosti RR proteinu byla srovnatelná s aktivací AfGcHK WT nebo AfGcHK L68F za stejných podmínek.

Tabulka 16: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45W.

| Y45W | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 44,7 ± 9,5 | 5,6 ± 1,2 | |
| | 15s | 50,0 ± 12,5 | 6,3 ± 1,6 | 10,8 ± 5,4 |
| | 5 min | 50,7 ± 11,5 | 6,3 ± 1,6 | 12,4 ± 5,1 |
| AfGcHK + RR | 0s | 42,3 ± 7,0 | 5,3 ± 0,9 | |
| | 15s | 56,7 ± 4,0 | 7,1 ± 0,5 | 36,0 ± 15,0 |
| | 5 min | 55,7 ± 5,0 | 7,0 ± 0,6 | 33,8 ± 17,7 |

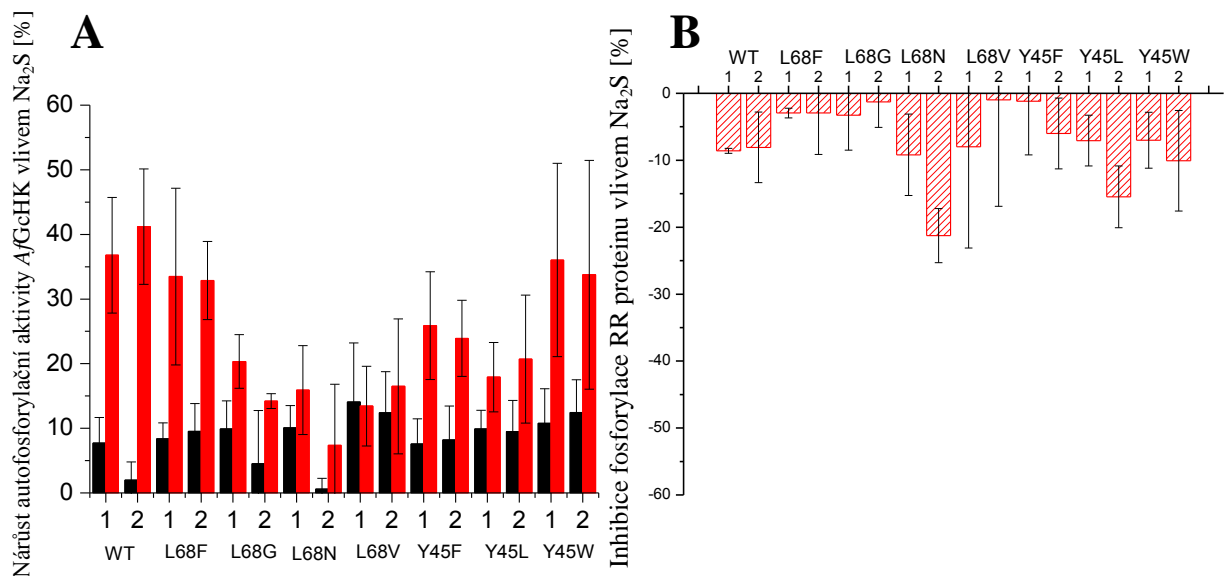
Tabulka 17: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu na RR v přítomnosti AfGcHK Y45W.

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojtě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| P-transfer RR | 0s | 14,3 ± 2,9 | 1,4 ± 0,3 | 29,0 ± 6,7 | 2,9 ± 0,7 | |
| | 15 s | 15,3 ± 3,8 | 1,5 ± 0,4 | 25,3 ± 5,9 | 2,6 ± 0,6 | -7,0 ± 4,2 |
| | 5 min | 14,3 ± 0,9 | 1,4 ± 0,1 | 24,0 ± 4,3 | 2,4 ± 0,4 | -10,1 ± 7,5 |

4.2.2.1. Porovnání vlivu Na₂S na enzymové aktivity AfGcHK WT a jeho mutantů

Doba pre-inkubace reakční směsi proteinu s Na₂S před stanovením enzymové aktivity daného AfGcHK proteinu korespondovala s významnými spektrálními změnami způsobenými přidavkem Na₂S k stejnému proteinu. Na obrázku 34A (str. 74) je zobrazen nárůst autofosforylační aktivity AfGcHK jak v přítomnosti RR proteinu (červené sloupce), tak bez obsahu RR proteinu (černé sloupce). Na obrázku 34B (str. 74) je zobrazena inhibice fosforylace RR vlivem Na₂S, opět v časech korespondujících s významnými spektrálními změnami způsobenými přidavkem Na₂S. Enzymové aktivity jednotlivých proteinů jsou vztaženy k hodnotě aktivity daného enzymu naměřené bez Na₂S. Data označena číslem 1 korespondují s krátkou dobou pre-inkubace reakční směsi s Na₂S tj. v rámci vteřin, kromě proteinů AfGcHK L68G, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 8 minut, a AfGcHK L68V, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 6 minut. Data označena číslem 2 korespondovala s dlouhou dobou pre-inkubace reakční směsi s Na₂S tj. v rámci jednotek až desítek minut. Vliv Na₂S na fosforylaci RR proteinu byl sledován z důvodu ověření, že k nárůstu autofosforylační aktivity AfGcHK nedochází pouze v důsledku inhibice fosforylace RR proteinu. Experimenty byly zopakovány minimálně třikrát. Ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Směrodatná odchylka byla relativně velká, protože se jednalo o různé enzymově aktivní preparáty proteinů a jednak k chybě přispěla použitá metoda phos-tag SDS-PAGE, která je zatížená chybou vyhodnocení.

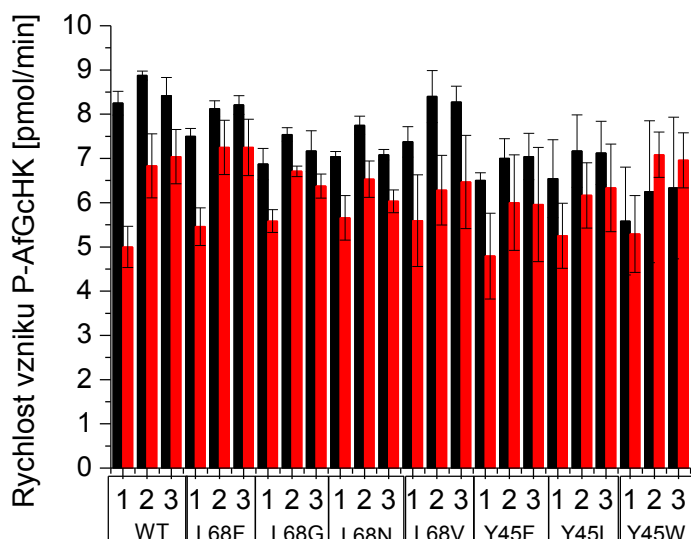
Přidavkem Na₂S byla nejvíce ovlivněna aktivita AfGcHK WT, AfGcHK L68F a AfGcHK Y45W. Ve většině případů došlo k zvýšení autofosforylační aktivity AfGcHK, pokud byl v inkubační směsi přítomen RR protein. Výjimkou je protein AfGcHK L68V, kde v případě absence RR proteinu byla jeho autofosforylační aktivita vyšší než za přítomnosti RR proteinu. Nejvýraznější inhibice fosforylace RR proteinu byla zaznamenána u AfGcHK L68N při dlouhodobé pre-inkubaci s Na₂S (21,3%) a AfGcHK Y45L opět při dlouhodobé pre-inkubaci s Na₂S (15,5%).



Obrázek 34: Aktivace autofosforylační aktivity AfGcHK (A) a inhibice fosforylace RR proteinu (B) způsobená přidavkem Na₂S. Nárůst aktivity jednotlivých proteinů je vztažen k hodnotě aktivity naměřené bez Na₂S. Porovnány jsou hodnoty získané jak bez obsahu RR proteinu (■), tak v přítomnosti RR proteinu (■). 1 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin kromě proteinů AfGcHK L68G, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 8 minut, a AfGcHK L68V, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 6 minut, číslo 2 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována delší dobu tj. v rámci jednotek až desítek minut.

Rychlost vzniku P-AfGcHK (tj. efektivita autofosforylace AfGcHK) je zobrazena na obrázku 35 (str. 75). Parametr rychlosti enzymové reakce je absolutní hodnotou na rozdíl od obrázku 34, ve kterém je prezenotvána enzymová aktivita jednotlivých proteinů vztažena k hodnotě aktivity daného enzymu naměřené bez Na₂S. Proto jsou v tomto obrázku číslem 1 označeny experimenty provedené bez přidavku Na₂S. Číslo 2 označuje směs, která byla s Na₂S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin, kromě proteinů AfGcHK L68G, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 8 minut, a AfGcHK L68V, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 6 minut. Číslo 3 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována delší dobu (jednotky až desítky minut). Jsou zde opět porovnány hodnoty získané jak v přítomnosti RR proteinu (červené sloupce), tak bez obsahu RR proteinu (černé sloupce). Doba pre-inkubace reakční směsi proteinu s Na₂S korespondovala s významnými spektrálními změnami způsobenými přidavkem Na₂S k proteinu. V tomto případě je jasné vidět, že směrodatné odchylky jsou významně nižší. I z toho grafického vyjádření naměřených dat vyplývá, že ve většině případů došlo ke zvýšení rychlosti

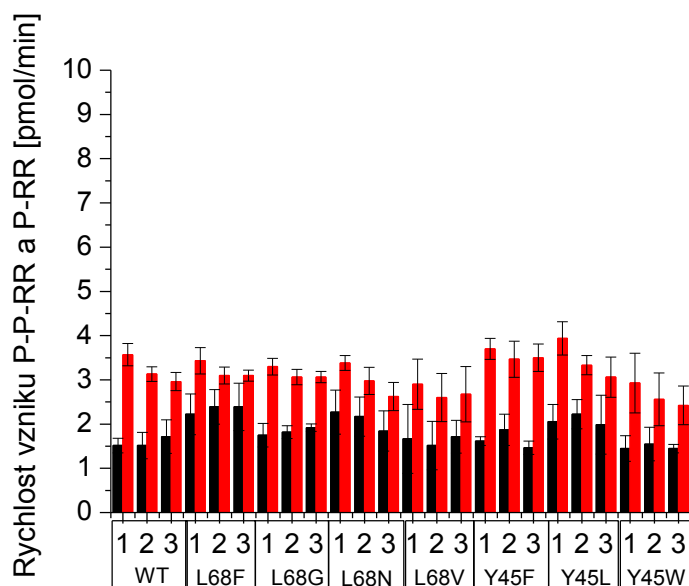
autofosforylace AfGcHK, pokud byl v inkubační směsi přítomen RR protein (červené sloupce). Nicméně je třeba poznamenat, že rychlost vzniku fosforylovaného AfGcHK byla u většiny proteinů (výjimkou byl protein AfGcHK Y45W) vyšší v případě, že nebyl přítomen RR protein. Pokud byl přítomen RR protein, byla rychlost vzniku P-AfGcHK nižší, ale současně byl pozorován výraznější vliv Na₂S na tuto rychlost.



Obrázek 35: Rychlost vzniku P-AfGcHK ovlivněná přidavkem Na₂S. Porovnány jsou hodnoty získané jak bez obsahu RR proteinu (■), tak v přítomnosti RR proteinu (■). Číslem 1 jsou označeny hodnoty naměřené bez přidavku Na₂S. Číslo 2 označuje směs, která byla s Na₂S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin kromě proteinů AfGcHK L68G, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 8 minut, a AfGcHK L68V, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 6 minut a označení 3 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována delší dobu tj. v rámci jednotek až desítek minut. Rychlost vzniku P-AfGcHK je ve většině případů vyšší za absence RR proteinu. Za přítomnosti je rychlost vzniku P-AfGcHK nižší, ale je pozorován vyšší vliv Na₂S na tuto rychlost.

Na obrázku 36 (str. 76) je zobrazena rychlost tvorby fosforylovaného a dvojitě fosforylovaného RR proteinu. Je patrné, že rychlost vzniku P-P-RR a P-RR nebyla významně ovlivněna pre-inkubací s Na₂S. Doba pre-inkubace reakční směsi proteinu s Na₂S korespondovala s významnými spektrálními změnami způsobenými přidavkem Na₂S. Číslem 1 jsou označeny hodnoty naměřené bez přidavku Na₂S. Označení 2 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin, kromě proteinů AfGcHK L68G, kde krátká pre-inkubace s Na₂S probíhala 8 minut, a AfGcHK L68V, kde

krátká pre-inkuace s Na_2S probíhala 6 minut, označení číslem 3 odpovídá směsi, která byla s Na_2S inkubována delší dobu (jednotky až desítky minut).



Obrázek 36: Rychlost tvorby fosforylovaného (■) a dvojtě fosforylovaného (■) RR proteinu ovlivněna přidavkem Na_2S . Číslem 1 jsou označeny hodnoty naměřené bez přidavku Na_2S . Označení 2 odpovídá směsi, která byla s Na_2S inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin kromě proteinů AfGcHK L68G, kde krátká pre-inkubace s Na_2S probíhala 8 minut, a AfGcHK L68V, kde krátká pre-inkuace s Na_2S probíhala 6 minut. Číslo 3 odpovídá směsi, která byla s Na_2S inkubována delší dobu tj. v rámci jednotek až desítek minut. Není pozorován významný vliv pre-inkubace s Na_2S .

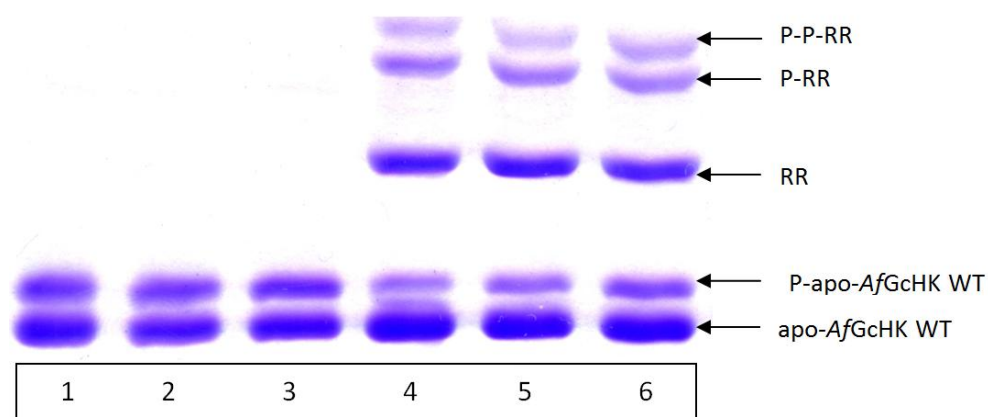
4.2.3. Vliv Na_2S na enzymové aktivity částečných apofořem AfGcHK WT, AfGcHK L68F a AfGcHK Y45W

V předchozí části jsme popsali stimulační vliv Na_2S na enzymovou aktivitu AfGcHK WT a jeho mutantů. Zbývá prokázat, zda Na_2S ovlivňuje aktivitu proteinu vazbou na hem v senzorové části proteinu. Proto byly připraveny apoformy proteinů AfGcHK WT, AfGcHK L68F a AfGcHK Y45W. Pro přípravu apoformy AfGcHK bylo použito několik metod, které jsou blíže popsány v kapitole 3.3.4. (str. 35).

Čistá apoforma studovaných proteinů se nám nepodařila připravit. Nejmenší obsah hemu měly proteiny připravené postupem popsaným v kapitole 3.3.4.1. (str. 35), který spočíval ve vynechání inkubace heminu s lyzátem buněk. Přesto tyto proteiny nebyly úplně

bez obsahu hemu. AfGcHK WT se podařilo izolovat jako 80% apoformu, AfGcHK L68F jako 95,5% apoformu a AfGcHK Y45W jako 84% apoformu. Tyto preparáty byly využity pro další experimenty, protože obsahovaly nejnižší množství hemu.

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK WT (80% apoforma) (viz kapitola 3.3.9., str. 39) je zobrazen na obrázku 37. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK WT (80% apoforma) proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Doba pre-inkubace s Na₂S korespondovala se spektrálními změnami proteinu způsobenými přidavkem Na₂S. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S 75 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 75 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 37: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity 80% apo-AfGcHK WT ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK WT. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 75 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 75 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK WT (80% apoforma) byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK WT (80% apoforma) jsou zobrazeny

v tabulce 18 (str. 78), hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 19 (str. 78). Experiment byl zopakován dvakrát. Je zajímavé že autofosforylační aktivita AfGcHK WT (80% apoforma) je výrazně nižší než aktivita holo-AfGcHK WT.

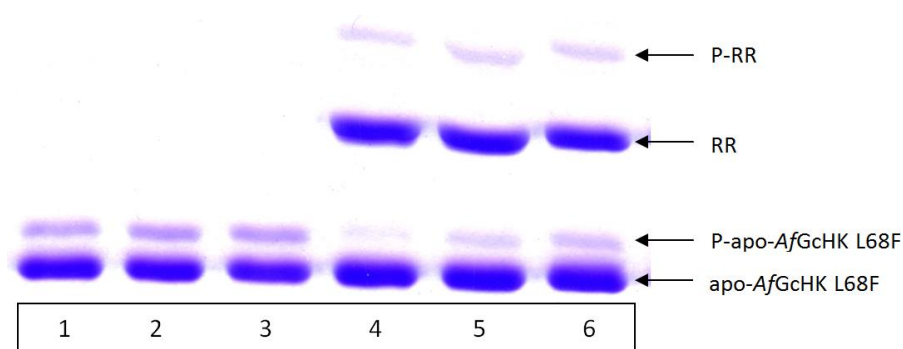
Tabulka 18: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu 80% apoformy AfGcHK WT.

| Apo-WT | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 46,5±4,6 | 5,8 ± 0,6 | |
| | 75s | 46,0 ± 3,0 | 5,8 ± 0,4 | -0,8 ± 3,2 |
| | 75 min | 42,0 ± 0,0 | 5,3 ± 0,0 | -8,8 ± 8,8 |
| AfGcHK + RR | 0s | 17,0 ± 3,0 | 2,1 ± 0,4 | |
| | 75s | 26,5 ± 0,5 | 3,3 ± 0,1 | 61,4 ± 31,4 |
| | 75 min | 31,0 ± 1,0 | 3,9 ± 0,1 | 87,1 ± 27,5 |

Tabulka 19: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti apo-AfGcHK WT.

| | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojitě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol / min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| P-transfer RR | 0s | 10,0 ± 4,0 | 1,0 ± 0,4 | 26,0 ± 2,0 | 2,6 ± 0,2 | |
| | 75 s | 11,0 ± 1,0 | 1,1 ± 0,1 | 26,5 ± 0,5 | 2,7 ± 0,5 | 6,4 ± 13,6 |
| | 75 min | 13,0 ± 6,0 | 1,3 ± 0,6 | 24,0 ± 2,0 | 2,4 ± 0,2 | 1,9 ± 5,2 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68F (95,5% apoforma) (viz kapitola 3.3.9., str. 39) je zobrazen na obrázku 38 (str. 79). Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68F (95,5% apoforma) proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Doba pre-inkubace s Na₂S korespondovala se spektrálními změnami proteinu způsobenými přidavkem Na₂S. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 53 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 38: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity 95,5% apoformy AfGcHK-L68F ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci apo-AfGcHK L68F. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 53 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK L68F (95,5% apoforma) byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK L68F (95,5% apoforma) jsou zobrazeny v tabulce 20, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 21 (str. 80). Experiment byl zopakován dvakrát. Autofosforylační aktivita AfGcHK L68F (95,5% apoforma) je výrazně nižší než autofosforylační aktivita holo-AfGcHK L68F a to tak, že reakce v přítomnosti RR téměř neprobíhá. Z tohoto důvodu je velmi těžké kvantifikovat a vyhodnocovat vliv Na₂S na tuto reakci. Byl pozorován výrazný nárůst autofosforylační aktivity AfGcHK L68F (95,5% apoforma) v přítomnosti RR proteinu, nicméně je velmi pravděpodobné, že tento výsledek je ovlivněn velkou chybou analýzy dat daného experimentu v důsledku nízké aktivity AfGcHK L68F (95,5% apoforma).

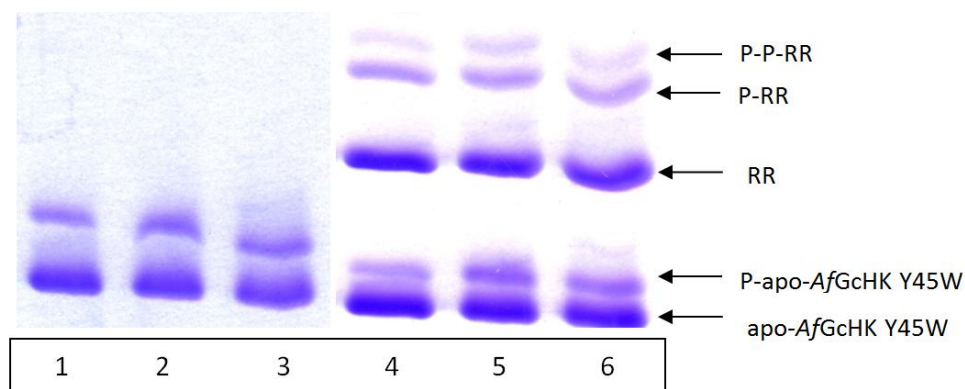
Tabulka 20: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu 95,5% apoformy AfGcHK L68F.

| Apo-L68F | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 17,0 ± 1,0 | 2,1 ± 0,1 | |
| | 15s | 19,0 ± 1,0 | 2,4 ± 0,1 | 11,8 ± 0,7 |
| | 53 min | 20,5 ± 0,5 | 2,6 ± 0,1 | 20,8 ± 4,2 |
| AfGcHK + RR | 0s | 2,5 ± 0,5 | 0,3 ± 0,1 | |
| | 15s | 6,5 ± 0,5 | 0,8 ± 0,1 | 175,0 ± 75,0 |
| | 53 min | 9,0 ± 1,0 | 1,1 ± 0,1 | 283,3 ± 116,7 |

Tabulka 21: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti apo-AfGcHK L68F.

| | dobu pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojtě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| P-transfer RR | 0s | 0 | 0 | 5,5 ± 0,5 | 0,6 ± 0,1 | |
| | 15 s | 0 | 0 | 6,5 ± 0,5 | 0,7 ± 0,1 | -20,0 ± 20,0 |
| | 53 min | 0 | 0 | 5,5 ± 1,5 | 0,6 ± 0,2 | -3,3 ± 36,7 |

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45W (84% apoforma) (viz kapitola 3.3.9., str. 39) je zobrazen na obrázku 39. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK L68W (84% apoforma) proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Doba pre-inkubace s Na₂S korespondovala se spektrálními změnami proteinu způsobenými přidavkem Na₂S. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 5 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 39: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity 84% apoformy AfGcHK-Y45W ovlivněnou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci apo-AfGcHK Y45W. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 15 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 5 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK Y45W (84% apoforma) ovlivněnou Na₂S byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK Y45W (84% apoforma) jsou zobrazeny v tabulce 22, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu jsou zobrazeny v tabulce 23. Hodnoty jsou průměry dvou paralelních měření. Autofosforylační aktivity AfGcHK Y45W (84 % apoforma) je výrazně nižší než autofosforylační aktivita holo-AfGcHK Y45W. Reakce v přítomnosti RR téměř neprobíhá. Z tohoto důvodu je velmi těžké kvantifikovat a vyhodnocovat vliv Na₂S na tuto reakci

Tabulka 22: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivity 84% apoformy AfGcHK Y45W.**

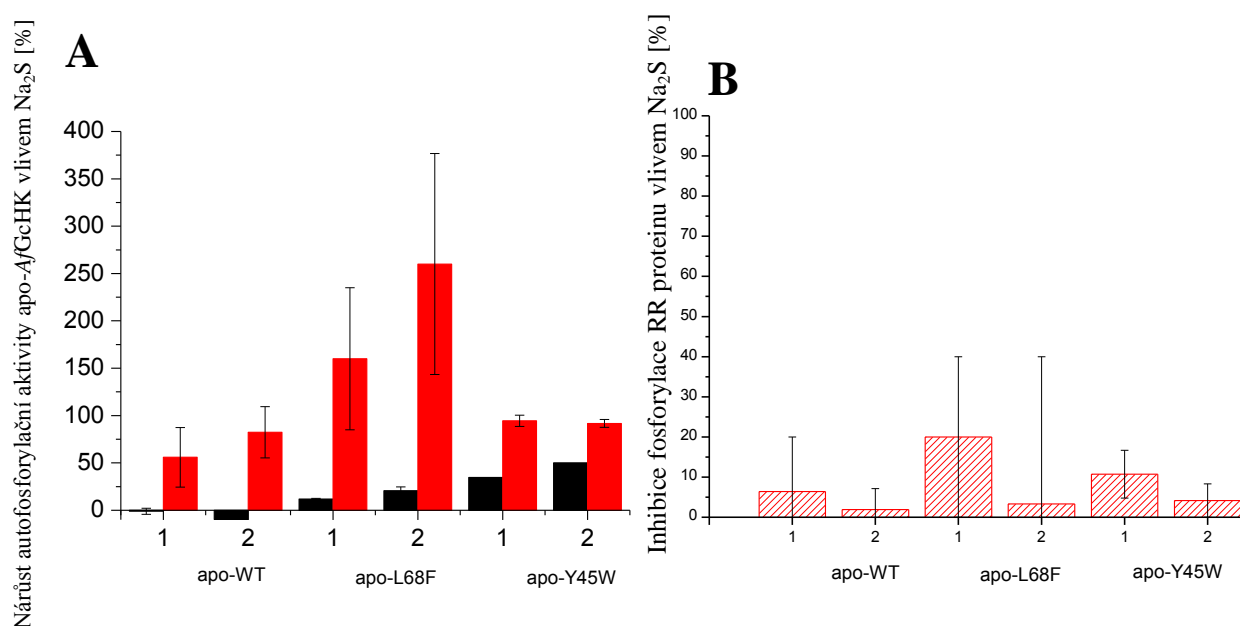
| Apo-L68F | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0s | 26,0 | 3,3 | |
| | 15s | 35,0 | 4,4 | 34,6 |
| | 5 min | 39,0 | 4,9 | 50,0 |
| AfGcHK + RR | 0s | 18,0 ± 1,0 | 2,3 ± 0,1 | |
| | 15s | 35,0 ± 2,0 | 4,4 ± 0,2 | 94,4 ± 0,3 |
| | 5 min | 34,5 ± 0,5 | 4,3 ± 0,1 | 92,1 ± 7,9 |

Tabulka 23: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti apo-AfGcHK Y45W.**

| | Doba pre-inkubace s Na ₂ S | % dvojitě fosforylovaného RR (P-P-RR) | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % fosforylovaného RR (P-RR) | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | Snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| P-transfer RR | 0s | 3,0 ± 1,0 | 0,3 ± 0,1 | 19,5 ± 0,5 | 2,0 ± 0,1 | |
| | 15 s | 6,0 ± 2,0 | 0,6 ± 0,2 | 19,0 ± 1,0 | 1,9 ± 0,1 | 10,7 ± 6,0 |
| | 5 min | 6,5 ± 0,5 | 0,7 ± 0,1 | 17,0 ± 0,3 | 1,7 ± 0,3 | 4,2 ± 4,2 |

Na obrázku 40 (str. 82) je zobrazen nárůst autofosforylačních aktivit vlivem Na₂S částečných apoform AfGcHK WT, AfGcHK L68F a AfGcHK Y45W. Porovnávány byly hodnoty získané jak v přítomnosti RR proteinu (červené sloupce), tak bez obsahu RR proteinu (černé sloupce). Doba pre-inkubace s Na₂S korespondovala se spektrálními

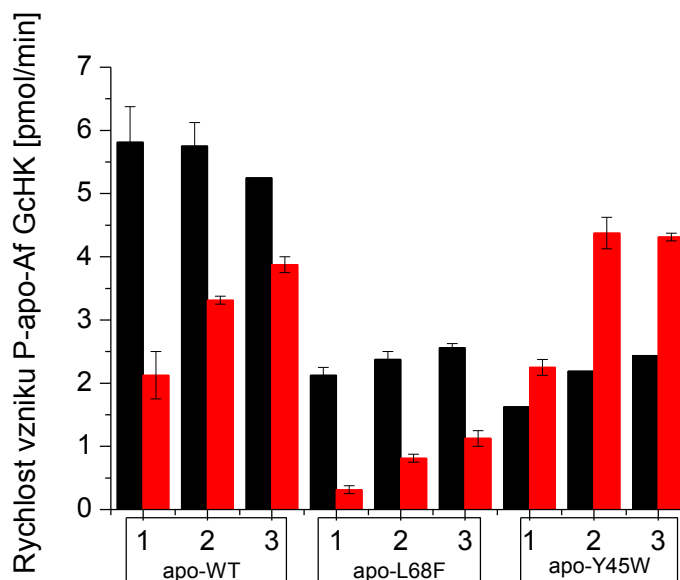
změnami proteinu způsobenými přidavkem Na_2S . Číslo 1 odpovídá směsi, která byla s Na_2S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin, označení 2 odpovídá směsi, která byla s Na_2S pre-inkubována delší dobu tj. jednotky až desítky minut. *AfGcHK* WT byl izolován z 80 % ve formě apoproteinu, *AfGcHK* L68F z 95,5 % ve formě apoproteinu a *AfGcHK* Y45W z 84 % ve formě apoproteinu. Došlo k výraznému navýšení autofosforylační aktivity u všech částečných apoforem proteinů a zároveň byl pozorován jen nepatrný vliv na proces fosforylace RR proteinu. Hodnoty jsou průměry dvou paralelních měření.



Obrázek 40: Aktivace autofosforylační aktivity apo-*AfGcHK* (A) a inhibice fosforylace RR proteinu (B) způsobená přidavkem Na_2S . Nárůst aktivity jednotlivých proteinů je vztažen k hodnotě aktivity naměřené bez Na_2S . Porovnány jsou hodnoty získané jak bez obsahu RR proteinu (■), tak v přítomnosti RR proteinu (■). Číslo 1 odpovídá směsi, která byla s Na_2S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin, označení 2 odpovídá směsi, která byla s Na_2S pre-inkubována delší dobu tj. v rámci jednotek až desítek minut. *AfGcHK* WT byl izolován z 80 % ve formě apoproteinu, *AfGcHK* L68F z 95,5 % ve formě apoproteinu a *AfGcHK* Y45W z 84 % ve formě apoproteinu.

Na obrázku 41 (str. 83) je zobrazena rychlost tvorby fosforylovaného apo-*AfGcHK*, opět v časech korespondujících s významnými spektrálními změnami způsobenými přidavkem Na_2S k proteinu. Pod číslem 1 jsou zobrazeny hodnoty naměřené bez přidavku Na_2S . Označení 2 odpovídá směsi, která byla s Na_2S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci

vteřin, označení 3 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována delší dobu (jednotky až desítky minut). Hodnoty jsou průměry dvou paralelních měření.



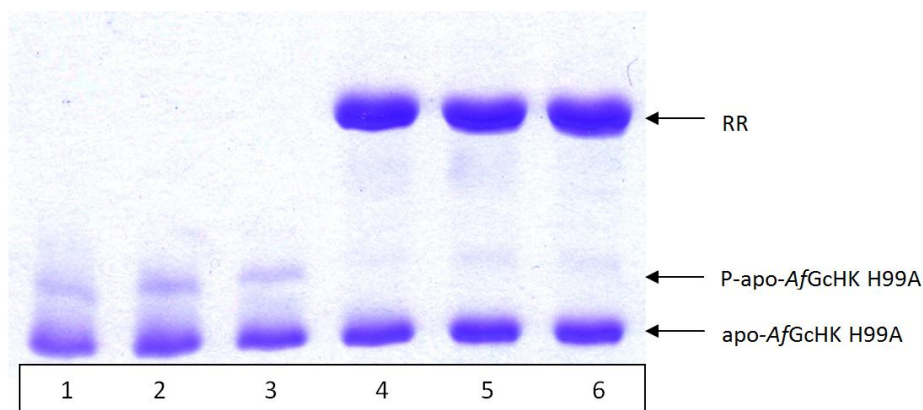
Obrázek 41: **Rychlost vzniku P-apo-AfGcHK ovlivněná přidavkem Na₂S.** Porovnány jsou hodnoty získané jak bez obsahu RR proteinu (■), tak v přítomnosti RR proteinu (■). Pod číslem 1 jsou zobrazeny hodnoty naměřené bez přidavku Na₂S. 2 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována kratší dobu tj. v rámci vteřin, 3 odpovídá směsi, která byla s Na₂S pre-inkubována delší dobu tj. v rámci jednotek až desítek minut. AfGcHK WT byl izolován z 80 % ve formě apoproteinu, AfGcHK L68F z 95,5 % ve formě apoproteinu a AfGcHK Y45W z 84 % ve formě apoproteinu.

4.2.4. Vliv Na₂S na enzymovou aktivitu AfGcHK H99A

Postupem popsáním v kapitole 3.3.4.1. (str. 35) byl úspěšně izolován protein AfGcHK H99A, který má histidin 99 nahrazen alaninem. Tento protein ztrácí schopnost koordinovat hem [36] a proto se vyskytuje v plné apoformě.

Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9., str. 39) ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK H99A ovlivněnou přidavkem Na₂S je zobrazen na obrázku 42 (str. 84). Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK H99A proteinu. Vzorky se odlišují dobou pre-inkubace s Na₂S a přítomností RR proteinu. Ve vzorcích 1 a 4 nebyl přítomen Na₂S. Tyto vzorky jsou dále označovány jako vzorky, kde Na₂S působil 0 s. Vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 75 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 75 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR

protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Vlastní enzymová reakce probíhala po přidavku ATP vždy 60 sekund (viz kapitola 3.3.8., str. 38).



Obrázek 42: Gel získaný pomocí phos-tag SDS-PAGE ilustrující změnu enzymové aktivity AfGcHK H99A způsobenou přidavkem Na₂S. Všechny vzorky obsahují stejnou koncentraci AfGcHK H99A. Vzorky 1 a 4 nebyly pre-inkubovány s Na₂S, vzorky 2 a 5 byly pre-inkubovány s Na₂S po dobu 75 s a vzorky 3 a 6 byly pre-inkubovány s Na₂S 75 minut. Reakční směs pro vzorky 1 až 3 neobsahovala RR protein, reakční směs pro vzorky 4 až 6 RR protein obsahovala. Reakce s ATP probíhala vždy 60 vteřin (viz kapitola 3.3.8., str. 38).

Data získaná prostřednictvím phos-tag SDS-PAGE popisující změnu enzymové aktivity AfGcHK H99A způsobenou přidavkem Na₂S byla zpracována a vyhodnocena. Hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK H99A jsou zobrazeny v tabulce 24, hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR jsou zobrazeny v tabulce 25 (str. 85). Experiment byl zopakován dvakrát. V nepřítomnosti RR proteinu došlo jen k malému nárůstu v kinasové aktivitě AfGcHK H99A. P-P-RR protein nebyl vytvořen vůbec. AfGcHK H99A vykazuje zanedbatelnou autofosforylační aktivitu a ani Na₂S není schopno tuto aktivitu ovlivnit (ať v přítomnosti nebo absence RR).

Tabulka 24: Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na autofosforylační aktivitu AfGcHK H99A.

| H99A | doba pre-inkubace s Na ₂ S | % P-AfGcHK | rychlost tvorby P-AfGcHK [pmol/min] | zvýšení aktivity AfGcHK [%] |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| AfGcHK | 0 s | 17,5 ± 7,5 | 2,2 ± 0,9 | |
| | 75 s | 21,0 ± 7,0 | 2,6 ± 0,9 | 26,0 ± 14,0 |
| | 75 min | 16,5 ± 2,5 | 2,1 ± 0,3 | 8,0 ± 32,0 |
| AfGcHK + RR | 0 s | 1,0 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 | |
| | 75 s | 3,5 ± 0,5 | 0,4 ± 0,1 | 250,0 ± 50,0 |
| | 75 min | 3,0 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 | 200,0 ± 0,0 |

Tabulka 25: **Průměrné hodnoty týkající se vlivu Na₂S na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti AfGcHK H99A.**

| | doba pre- inkubace s Na ₂ S | % P-P-RR | rychlost tvorby P-P-RR [pmol /min] | % P-RR | rychlost tvorby P-RR [pmol/min] | snížení fosfotransferové aktivity [%] |
|------------------|--|----------|--|-----------|---------------------------------------|---|
| P-transfer RR | 0s | 0 | 0 | 2,0 ± 1,0 | 0,2 ± 0,1 | |
| | 75s | 0 | 0 | 2,0 ± 1,0 | 0,2 ± 0,1 | 0,0 ± 0,0 |
| | 75 min | 0 | 0 | 2,0 ± 1,0 | 0,2 ± 0,1 | 0,0 ± 0,0 |

5. Diskuse

Stejně jako CO a NO je v současné době i sulfan přiřazován k signálním molekulám [53]. CO moduluje mimo jiné několik signálních drah vazbou na solubilní GC nebo aktivací MAPK [52]. NO je důležitou regulační molekulou v nervovém a kardiovaskulárním systému [43]. Rozpoznání H₂S jako signální molekuly trvalo déle než u CO a NO, pravděpodobně proto že byly dlouhodobě známé jeho toxické účinky na organismus a nebyla popsána dráha jeho endogenní produkce [70]. Toxicita H₂S je porovnatelná s toxicitou kyanidu [57].

Ve fyziologickém prostředí se H₂S v roztoku vyskytuje ze 2/3 disproportionován za vzniku HS⁻ iontů [64]. Protože se proteiny vyskytují ve vodném prostředí organismu, potom vliv H₂S na tyto proteiny je v podstatě vlivem HS⁻ iontů. Tohoto faktu bylo využito při experimentech, kdy byl použit Na₂S místo H₂S. Na₂S ve vodném prostředí disociuje na sodíkové ionty a sulfidový anion, tento sulfidový iont reaguje s další molekulou vody za vzniku OH⁻ a HS⁻ [83].

Poté, co byl H₂S zařazen mezi signální molekuly, vyvstala potřeba popsat a vysvětlit mechanismus jeho působení na cílové proteiny. V případě, že regulovaným proteinem je hemoprotein, bylo nasnadě ověřit, zda je cílovým místem působení H₂S hem. Bylo zjištěno, že SH⁻ anion je schopen interagovat s iontem železa hemu za vzniku komplexu Fe(III)-SH za předpokladu, že tento ion je v oxidovaném stavu [65]. Polarita vazebného místa hemu má vliv na to, jak bude reagovat HS⁻ iont navázaný na hem. Pokud je okolí vazebného místa nepolární dojde k disociaci HS⁻ iontu z komplexu Fe(III)-SH beze změny redoxního stavu. Pokud je ovšem okolí vazebného místa polární, dojde vlivem další molekuly H₂S k redukci iontu železa z Fe(III) na Fe(II) stav a tvorbě hydrogendisulfidu [65]. Nicméně v literatuře se vyskytují také informace o tom, že Na₂S by mohl ovlivňovat regulované proteiny interakcí s klíčovými zbytky cysteinů [80]. Takto by tedy Na₂S mohl ovlivňovat nejen hemoproteiny, ale i jakékoliv jiné proteiny obsahující ve své struktuře aminokyselinu cystein. Účinky Na₂S na hemové sensorové proteiny byly již dříve zkoumány. Takahashi *et al.* zkoumal vliv Na₂S na katalytickou aktivitu *Ec* DOS. *Ec* DOS patří mezi hemové sensorové proteiny s PAS strukturou sensorové domény [80]. Bylo prokázáno, že Na₂S pravděpodobně interaguje s hemem, který je lokalizován v PAS

senzorové doméně [80]. Dále bylo zjištěno, že kromě působení Na_2S na hem je pro regulaci *Ec* DOS prostřednictvím Na_2S podstatné také jeho působení na zbytky cysteinu [80]. Také Du *et al.* zkoumal vliv signální molekuly Na_2S na PAS doménu *Ec* DOS [84]. V tomto případě však překvapivě prokázal, že u dvou mutantů *Ec* DOS R97A a R97I se vlivem Na_2S iniciuje degradace hemu za vzniku verdohemu. Takové to působení Na_2S je však unikátní a bylo pozorováno pouze u těchto dvou výše uvedených mutantů *Ec* DOS [84].

V této práci byl zkoumán vliv Na_2S na modelové hemové senzorové proteiny s globinovou strukturou senzorové domény, konkrétně YddV a AfGcHK. Změny v senzorové doméně způsobené přidavkem Na_2S byly zkoumány UV-Vis spektrofotometrickým měřením. Využili jsme faktu, že přirozená forma obou senzorových hemoproteinů má charakteristické UV-Vis spektrum včetně polohy Soretova pásu a dalších pásů ve viditelné oblasti [36,38]. Sledovali jsme, jak se tato charakteristická spektra změni působením Na_2S . Dále jsme podrobili studiu také vybrané mutanty klíčových aminokyselin v okolí hemu, které jsou považovány za vazebné místo pro detekovanou molekulu kyslíku. Konkrétně se jednalo o mutanty leucinu a tyrosinu. V případě YddV je to leucin 65 [40] a tyrosin 43 [38] a ve struktuře AfGcHK má tento klíčový leucin pořadové číslo 68 a tyrosin pořadové číslo 45 [36]. Tyrosin je vazebným místem pro O_2 a o leucinu je známo, že stabilizuje vazbu mezi tyrosinem a kyslíkem [40]. Ve spektrech všech studovaných proteinů došlo ke změně v UV-Vis oblasti po působení Na_2S naznačující, že ve všech případech došlo k interakci mezi daným hemoproteinem a Na_2S .

Prvním modelovým proteinem studovaným v této práci, u kterého byl sledován vliv Na_2S , je YddV s globinovou strukturou senzorové domény. Spektrum YddV-HD WT se od spekter mutovaných proteinů významně lišilo. Chování YddV-HD WT ovlivněné přidavkem Na_2S bylo velmi podobné chování *Ec* DOS v přítomnosti Na_2S , které pozoroval Takahashi *et al.* [80]. Po přidavku Na_2S došlo v různých časových obdobích k modifikaci komplexu iontu železa hemu v proteinu a tyto nově vzniklé komplexy iontů železa hemu se manifestovaly vznikem typických spektrálních změn (viz obrázek 9, str. 42). Během prvních 9 minut působení Na_2S na YddV-HD WT protein došlo pravděpodobně ke vzniku komplexu Fe(III)-SH s malou příměsí komplexu Fe(II)- O_2 . Nicméně v čase 9,5 minut dominoval směsí komplex Fe(II)- O_2 . Po 90 minutách působení Na_2S na YddV-HD WT

protein byla detekována přítomnost pouze komplexu Fe(II). Struktury těchto komplexů hemu v modelových proteinech byly navrženy na základě charakteristických poloh pásů v UV-Vis spektrech a porovnání s publikovanými hodnotami známých komplexů [38]. Proteiny YddV-HD s mutovaným leucinem v pozici 65 se všechny chovaly po přidavku Na₂S velmi podobně a obsahovaly komplexy Fe(III)-SH, Fe(II)-O₂ a Fe(II) v různých poměrech (viz obrázky 10, str. 43 až 13, str. 46). Velmi zajímavá jsou spektra YddV-HD Y43A proteinu v přítomnosti Na₂S (viz obrázek 14, str. 47). Kitanishi *et al.* pozoroval unikátní vlastnost tohoto mutantu. Pokud zaměníme tyrosin 43 za alanin, ztrácí tento protein zcela afinitu ke kyslíku a není schopen tento plyn do své struktury již dále vázat [38]. Tento poznatek je velmi cenný při interpretaci spektrálních změn YddV-HD Y43A vyvolaných působením Na₂S, protože s dostatečným stupněm pravděpodobnosti můžeme předpokládat, že komplex Fe(II)-O₂ u tohoto mutantu nemůže vznikat [38]. Proto se domníváme, že spektrum získané po 5,5 minutách od přidavku Na₂S s maximem při 427 nm odpovídá vzniku pouze komplexu Fe(III)-SH lokalizovaného v YddV-HD Y43A bez příměsi Fe(II)-O₂. Toto je unikátní zjištění, neboť jsme pravděpodobně poprvé detekovali komplex Fe(III)-SH v případě hemových sensorových proteinů bez příměsi Fe(II)-O₂ na rozdíl od všech jiných sensorových hemoproteinů zpracovaných stejným způsobem. Tento poznatek nám umožnil interpretovat i další spektra hemových sensorových proteinů po působení Na₂S.

Pokud protein YddV obsahuje hemové komplexy Fe(III) a/nebo Fe(II)-O₂, vykazuje katalytickou aktivitu, zatímco protein s Fe(II) komplexem je neaktivní [38]. Z analogie s *Ec* DOS můžeme předpokládat, že také YddV protein obsahující Fe(III)-SH je aktivní [80]. Na₂S tedy pravděpodobně vede z počátku svého působení k aktivaci enzymové aktivity YddV, protože dochází k tvorbě Fe(III)-SH a Fe(II)-O₂ forem v různých poměrech a není zatím přítomna žádná Fe(II) forma. Postupem času s přibývajícím obsahem proteinu s inkorporovanou Fe(II) formou, dojde pravděpodobně naopak k inhibici enzymové aktivity funkční domény YddV. Bohužel jsme tento předpoklad nemohli ověřit, protože izolace proteinu YddV v celé jeho délce, to je obsahující jak sensorovou hemovou doménu, tak doménu funkční, která je enzymově aktivní, byla znemožněna jeho nestabilitou a tendencí precipitovat.

Druhým zkoumaným proteinem s globinovou strukturou senzorové domény byl *AfGcHK*. Změny spekter způsobené Na_2S jsou významné, avšak odlišné od analogických změn spekter ovlivněných přidavkem Na_2S k *Ec* DOS [80] a *YddV*-HD. Spektra *AfGcHK* WT zpočátku měření po přidavku Na_2S odpovídají přítomnosti směsi proteinů s komplexy Fe(III)-SH a Fe(II) s převažujícím množstvím komplexu Fe(III)-SH (pás při 418 nm). Postupem času dochází ke změně poměru mezi těmito složkami a po 75 minutách převažuje protein s komplexem Fe(II) . Přítomnost redukované formy iontu železa v komplexu s hemem byla prokázána interakcí s CO, protože tento plyn může interagovat pouze a jenom s redukovanou formou iontu železa komplexu hemu [5]. Spektrální změny způsobené přidavkem Na_2S k *AfGcHK* proteinům s mutovaným leucinem v pozici 68 se v jednotlivých případech lehce lišily. U proteinu *AfGcHK* L68F došlo k vytvoření směsi proteinů s komplexy Fe(III)-SH a Fe(II) s převažujícím množstvím komplexu Fe(III)-SH , relativně rychle a to během prvních 15 sekund působení Na_2S . V případě *AfGcHK* L68G a *AfGcHK* L68V byl vznik této směsi pomalejší, došlo k němu až po 8 minutách působení Na_2S v případě *AfGcHK* L68G a po 6 minutách působení Na_2S v případě *AfGcHK* L68V. Doba vzniku směsi proteinů s komplexy Fe(III)-SH a Fe(II) s převažujícím množstvím Fe(II) komplexu byla u leucinových mutantů kratší než u nemutovaného proteinu a to 53 minut v případě *AfGcHK* L68F a 51 minut v případě *AfGcHK* L68V. U proteinu *AfGcHK* L68G došlo ke vzniku této směsi již po 23 minutách působení s Na_2S . V případě proteinu *AfGcHK* L68N byla nejprve vytvořena směs proteinů obsahující komplexy Fe(III)-SH a Fe(II) s převahou Fe(III)-SH . Během měření ovšem nedošlo k tak výrazné změně poměru mezi těmito složkami a pravděpodobně byl hem proteinu *AfGcHK* L68N v tomto případě dlouhou inkubací s Na_2S degradován. U proteinů s mutovaným tyrosinem v pozici 45 docházelo ke konverzi mezi jednotlivými komplexy hemu vlivem Na_2S mnohem rychleji v porovnání s *AfGcHK* WT i s jeho leucinovými mutanty. U všech tyrosinových mutantů došlo ke vzniku první směsi proteinů s komplexy Fe(III)-SH a Fe(II) s převažujícím množstvím Fe(III)-SH komplexu bezprostředně po přidání Na_2S . Proces konverze této iniciační směsi forem hemu studovaného proteinu v podobnou směs proteinů, kde však převažovalo množství komplexu Fe(II) , byl u tyrosinových mutantů také velmi rychlý. V případě *AfGcHK* Y45F byla tato směs vytvořena již za 6 minut působení Na_2S , v případě *AfGcHK* Y45L za 14 minut působení Na_2S a nejrychleji, za 5 minut působení Na_2S , v případě *AfGcHK* Y45W.

Analogicky jako YddV, vykazuje *AfGcHK* obsahující hemové komplexy Fe(III) a Fe(II)-O₂ katalytickou aktivitu, zatímco protein s Fe(II) komplexem je neaktivní [36]. Z analogie s *Ec* DOS můžeme rovněž předpokládat, že také protein obsahující Fe(III)-SH komplex hemu je aktivní [80]. Na₂S tedy pravděpodobně vede z počátku svého působení k aktivaci enzymové aktivity *AfGcHK*. To když ve směsi převažuje množství Fe(III)-SH formy nad Fe(II) formou, která má inhibiční účinek na enzymovou aktivitu *AfGcHK*. Postupem času s přibývajícím podílem proteinu obsahujícím Fe(II) formou, dojde pravděpodobně naopak k inhibici enzymové aktivity funkční domény *AfGcHK*. Rozdíl mezi působením Na₂S na YddV a *AfGcHK* byl tedy v tom, že vlivem Na₂S na YddV vznikl protein obsahující mimo jiné komplex Fe(II)-O₂, který stejně jako Fe(III)-SH má stimulační vliv na enzymovou aktivitu. YddV se po působení Na₂S vyskytoval ve dvou aktivních formách a jedné formě potlačující enzymovou aktivitu funkční domény [Fe(II)]. Při pozorování vlivu Na₂S na *AfGcHK* nebyl vznik druhého aktivního komplexu kromě Fe(III)-SH detekován a kompetovala v tomto případě vzájemně pouze aktivní forma Fe(III)-SH s neaktivní formou Fe(II).

Abychom mohli potvrdit, že *AfGcHK* protein s Fe(III)-SH komplexem má enzymovou aktivitu, byly provedeny další pokusy. Ke zjištění, zda interakce mezi *AfGcHK* a Na₂S mohou ovlivnit enzymovou aktivitu funkční domény tohoto proteinu tak, jak bylo výše diskutováno, byla použita metoda phos-tag SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9, str. 39).

Změny v katalytické aktivitě způsobené Na₂S byly pozorovány na všech studovaných *AfGcHK* proteinech. Doba pre-inkubace proteinu s Na₂S byla pro každý protein jiná a korespondovala s významnými spektrálními změnami způsobenými přidávkou Na₂S k proteinu. V případě *Ec* DOS došlo k velmi výraznému nárůstu v jeho enzymové aktivitě vlivem Na₂S. Za aerobních podmínek byla fosfodiesterasová enzymová aktivita vlivem Na₂S až třicetkrát zvýšena [80]. K tak výraznému nárůstu v enzymové aktivitě došlo kombinací různých mechanismů působení Na₂S na protein. Konkrétně se jednalo o vazbu HS⁻ jako axiálního ligandu iontu železa hemu (vznik Fe(III)-SH komplexu), dále pak o redukci iontu železa hemu s následným vznikem Fe(II)-O₂ komplexu a konečně o modifikaci cysteinylových zbytků daného proteinu [80]. Stimulační vliv Na₂S na autofosforylační enzymovou aktivitu *AfGcHK* nebyl tak významný jako v případě *Ec* DOS, avšak zvýšení v aktivitě bylo pozorováno. Vlivem Na₂S došlo k nárůstu

autofosforylační aktivity *AfGcHK* až o 40%. Méně výrazné ovlivnění enzymové aktivity *AfGcHK* oproti *Ec* DOS je pravděpodobně způsobeno tím, že protein *AfGcHK* neobsahuje ve své sekundární struktuře žádný cystein [86], který by mohl být modifikován Na_2S . Navíc nebyla při spektrální analýze zjištěna přítomnost proteinu obsahujícího komplex Fe(II)-O_2 , který také přispívá ke zvýšení enzymové aktivity proteinu. Vlivem Na_2S na *AfGcHK* se tvořila směs pravděpodobně aktivního komplexu Fe(III)-SH a neaktivní formy Fe(II) . Tyto dvě formy byly zastoupeny v různých poměrech a tento jejich vzájemný poměr pak pravděpodobně rozhodoval o finálním vlivu na enzymovou aktivitu *AfGcHK*. Nárůst v autofosforylační aktivitě vlivem Na_2S byl nejvíce patrný u *AfGcHK* WT, *AfGcHK* L68F a *AfGcHK* Y45W. Aby bylo dokázáno, že ke zvýšení autofosforylační aktivity nedochází na úkor fosforylace RR proteinu, byla testována i změna v tomto procesu. Vlivem přítomnosti Na_2S sice došlo k inhibici fosforylace RR proteinu, nicméně tato inhibice nebyla tak signifikantní jako nárůst v autofosforylační aktivitě proteinu *AfGcHK*, a proto se domníváme, že nárůst autofosforylační aktivity není způsoben primárně inhibicí fosforylace RR proteinu. Je důležité zmínit, že přítomnost RR proteinu způsobovala zdánlivý pokles v rychlosti vzniku P-AfGcHK , protože ten je dále využíván k fosforylaci RR proteinu. Vliv Na_2S na enzymovou aktivitu *AfGcHK* v přítomnosti RR proteinu byl výraznější než v případě absence RR proteinu v inkubační směsi.

UV-Vis spektrální analýzy proteinu *AfGcHK* dokazují přítomnost proteinu s komplexem Fe(II) , který podle Kitanishi *et al.* postrádá svou enzymovou aktivitu [36]. Přesto byl naměřen nárůst v autokinasové aktivitě proteinu i ve směsi, kde převažovalo množství komplexu Fe(II) . Toto pozorování nás vede k domněnce, že autofosforylační enzymová aktivita proteinu obsahující komplex Fe(III)-SH musí výrazně převýšit aktivitu proteinu s Fe(III) komplexem. V opačném případě by nebylo možné pozorovat nárůst v enzymové aktivitě, kterou jsme ovšem opakovaně pozorovali (i když jen v řádu několika desítek procent) ve směsi, která po působení Na_2S kromě Fe(III)-SH prokazatelně obsahuje také enzymově neaktivní formu proteinu s Fe(II) komplexem. Celková enzymová aktivita dané směsi různých forem hemu v *AfGcHK* je dána příspěvkem obou složek. Pokud vliv enzymově aktivní složky převáží vliv inhibiční formy, je pravděpodobně tato enzymově aktivní forma výrazně více aktivní, než se jeví z experimentů studujících směsné preparáty.

Pro potvrzení předpokladu, že Na_2S působí na protein prostřednictvím hemu, byly provedeny pokusy o přípravu apoformy vybraných AfGcHK proteinů. Jednalo se o proteiny AfGcHK WT, AfGcHK L68F a AfGcHK Y45W. Bohužel se nepodařilo připravit úplné apoformy těchto proteinů. Další pokusy proto byly provedeny s proteiny obsahujícími co nejmenší množství hemu (80% apo-AfGcHK WT, 95,5% apo-AfGcHK L68F a 84% apo-AfGcHK Y45W). Z měření enzymových aktivit těchto proteinů vyplývá, že čím méně hemu protein obsahuje, tím nižší je jeho enzymová aktivita. Je zajímavé, že čím nižší byla naměřená enzymová aktivita bez přídavku Na_2S , tím výraznější byl vliv Na_2S na tuto aktivitu. Částečné apoformy stále obsahovaly malé množství hemu a mohl tedy vznikat majoritně protein obsahující komplex Fe(III)-SH, který vykazoval výrazný aktivační vliv na autofosforylační aktivitu AfGcHK. Protože proteiny stále obsahovaly malé množství hemu a nebylo tak možné dojít ke konklusivním výsledkům, byl připraven ještě jeden mutovaný protein, konkrétně AfGcHK H99A. Tento protein obsahuje ve vazebném místě pro hem alanin místo histidinu a tudíž hem vůbec vázat nemůže [36]. Byla tedy provedena studie vlivu Na_2S na enzymovou aktivitu proteinu AfGcHK H99A. Konzistentně s experimenty využívající částečné apoformy AfGcHK úplná apoforma proteinu AfGcHK (AfGcHK H99A) vykazovala výrazně sníženou enzymovou aktivitu. Z těchto měření tedy usuzujeme, že hem je důležitý jak pro samotnou enzymovou aktivitu proteinu, tak pro ovlivnění této aktivity Na_2S . Čím nižší byla aktivita proteinu bez Na_2S tím výraznější byl nárůst v aktivitě po přídavku Na_2S . Tato tendence se objevovala jak u částečných apoform proteinů, tak u AfGcHK H99A. Příčinou této tendence bude pravděpodobně fakt, že v případě tak nízké intenzity detekované frakce proteinu phos-tag SDS-PAGE může jen malá odchylka v kalkulaci způsobit velkou chybu.

H_2S se fyziologicky vyskytuje v pikomolárních koncentracích v krvi a v některých tkáních může jeho množství dosáhnout až nanomolární koncentrace [63]. V této práci byly studovány *in vitro* systémy, které obsahovaly milimolární koncentrace Na_2S a poměr mezi koncentrací Na_2S a koncentrací modelového proteinu byl tisíc ku jedné. Takovéto koncentrace Na_2S (respektive HS^-) nejsou fyziologicky relevantní. Nicméně data získaná měřením s vysokým nadbytkem Na_2S dovolují studovat a diskutovat mechanismus interakce této signální molekuly s modelovými proteiny a podstatu ovlivnění jejich enzymové aktivity. Je velmi pravděpodobné, že k podobným procesům bude docházet i při fyziologické koncentraci SH^- , případně také může dojít k lokálnímu nahromadění signální

molekuly H_2S . Předpokádáme tedy, že fyziologicky se vyskytující HS^- ionty mohou mít regulační vliv na enzymovou aktivitu senzorových proteinů.

6. Závěr

Cíle práce, které byly vytyčeny na začátku řešení dané problematiky, byly splněny.

1. Byl úspěšně izolován modelový sensorový protein *AfGCHK* včetně jeho leucinových i tyrosinových mutantů. V případě druhého modelového sensorového proteinu, *YddV* se úspěšně podařilo izolovat jeho sensorovou doménu obsahující hem (*YddV*-HD). Rovněž byly připraveny leucinové a tyrosinové mutanty *YddV*-HD proteinu.

2. Pomocí UV-Vis spektrofotometrie byla studována interakce Na_2S se sensorovou doménou modelových sensorových proteinů. Spektra jednotlivých modelových proteinů a jejich mutantů byla porovnána se spektry těchto proteinů ovlivněných přítomností Na_2S . Spektra všech studovaných proteinů naznačují, že v přítomnosti Na_2S došlo ke změně v hemovém okolí proteinu. Nejzajímavější jsou spektra získaná přidávkem Na_2S k proteinu *YddV*-HD Y43A, která poukazují na přítomnost čistého komplexu Fe(III)-SH v tomto proteinu z důvodu unikátních vlastností tohoto mutovaného proteinu. Tato spektra byla využita pro interpretaci spekter ostatních proteinů. Vlivem působení Na_2S na *YddV*-HD vzniká protein obsahující směs komplexů Fe(III)-SH , Fe(II)-O_2 a Fe(II) . Působí-li Na_2S na *AfGCHK*, pak se ve směsi vyskytují v čase proměnné poměry komplexů Fe(III)-SH a Fe(II) .

3. Studium vlivu interakce Na_2S se sensorovou doménou *AfGCHK* na autofosforylační aktivitu funkční domény naznačilo možný mechanismus tohoto procesu. Zajímavým výsledkem je, že došlo k výraznější stimulaci autokinasové aktivity *AfGCHK* vlivem Na_2S za přítomnosti RR proteinu. K nejvýraznějšímu ovlivnění v enzymové aktivitě Na_2S došlo v případě proteinů *AfGCHK* WT, *AfGCHK* L68F a *AfGCHK* Y45W. Výsledně jsme došli k závěru, že hem je v tomto modelovém sensorovém proteinu důležitý jak pro samotnou enzymovou aktivitu, tak pro ovlivnění této enzymové reakce Na_2S . *AfGCHK* obsahující Fe(III)-SH komplex je pravděpodobně více enzymově aktivní než bazální forma tohoto proteinu [obsahující komplex Fe(III)].

7. Seznam použité literatury

1. Voet, D., Voet, J. G.: *Biochemistry (4th edition)*, JOHN WILEY & SONS, Hoboken, NJ (2011).
2. Kolektiv: Biochemie, skriptum PřF UK Praha, str. 46 (2009).
3. Green, J., Crack, J. C., Thomson, A. J., LeBrun N. E.: *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 145-151 (2009).
4. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harper's illustrated biochemistry (26 th edition)*, McGraw-Hill, New York (2003).
5. Kajimura, M., Fukuda, R., Bateman, R. M., Yamamoto, T., Suematsu, M.: *Antioxid. Redox Sign.* 13, 157-192 (2010).
6. Ortiz de Montellano, P. R.: *Acc. Chem. Res.* 20, 289-294 (1987).
7. Sasakura, Y., Yoshimura-Suzuki, T., Kurokawa, H., Shimizu, T.: *Acc. Chem. Res.* 39, 37-43 (2006).
8. Liebl, U., Lambry, J.-C., Vos, M. H.: *Biochimi. Biophys. Acta.* 1834, 1684-1692 (2013).
9. *Proceedings of the 15th international conference on cytochromes P450 - biochemistry, biophysics and functional genomics.* Shimizu, T., Hikage, N., Kitanishi, K., Murase, M., Iizuka, A., Ishikawa, S., Ishitsuka, K., Saiful, I., Yamauchi, S., Tanaka, A., Martinkova, M., Igarashi, J., Sagami, I.: Bled, Slovenia, June 17-21, page 31-38 (2007).
10. Yoshii, K., Ishijima, S., Sagami, I.: *Biochem. Biophys. Res. Communications.* 437, 386-391 (2013).
11. Miksanova, M., Igarashi, J., Minami, M., Sagami, I., Yamauchi, S., Kurokawa, H., Shimizu, T.: *Biochemistry.* 45, 9894-9905 (2006).
12. Igarashi, J., Kitanishi, K., Martinkova, M., Murase, M., Iizuka, A., Shimizu, T.: *Acta Chim. Slov.* 55, 67-74 (2008).
13. Gilles-Gonzalez, M.-A., Gonzalez, G.: *J. Inorg. Biochem.* 99, 1-22 (2005).
14. Germani, F., Moens, L., Dewilde, S.: *Adv. Microb. Physiol.* 63, 1-47 (2013).
15. Puranik, M., Nielsen, S. B., Youn, H., Hvitved, A. N., Bourassa, J. L., Case, M. A., Tengroth, C., Balakrishnan, G., Thorsteinsson, M. V., Groves, J. T., McLendon, G. L., Roberts, G. P., Olson, J. S., Spiro, T.G.: *J. Biol. Chem.* 279, 21096-21108 (2004).
16. Reynolds, M. F., Parks, R. B., Burstyn, J. N.: *Biochemistry.* 39, 388-396 (2000).
17. Girvan, H. M., Munro, A. W.: *J. Biol. Chem.* 288, 13194-13203 (2013).

18. Aono, S., Honma, Y., Ohkubo, K., Tawara, T., Kamiya, T., Nakajima, H.: *J. Inorg. Biochem.* 82, 51-56 (2000) .
19. Cary, S. P. L., Winger, J. A., Derbyshire, E. R., Marletta, M. A.: *Trends Biochem. Sci.* 31, 231-239 (2006).
20. Boon, M. B., Marletta, M. A.: *J. Inorg. Biochem.* 99, 892-902 (2005).
21. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A.: *J. Mol. Biol.* 308, 449-455 (2001).
22. Soupène, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., Batut, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3759-3763 (1995).
23. Ulrich, L. E., Koonin, E. V., Zhulin, I. B.: *Trends Microbiol.* 13, 52-56 (2005).
24. Hefti, M. H., François, K. J., de Vries, S. C., Dixon, R., Vervoort, J.: *Eur. J. Biochem.* 271, 1198-1208 (2004).
25. Montgomery, B. L., Lagarias, J. C.: *Trends Plant Sci.* 7, 357–366 (2002).
26. Zoraghi, R., Corbin, J. D., Francis, S. H.: *Mol. Pharmacol.* 65, 267–278 (2004).
27. Dasgupta, N., Kapur, V., Singh, K. K., Das, T. K., Sahdeva, S., Jyothisri, K., Tyagi, J. S.: *Tuber. Lung Dis.* 80, 141-159 (2000).
28. Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R. Jr., Steyn, A. J. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 11568-11573 (2007).
29. Lee, J. M., Cho, H. Y., Cho, H. J., Ko, I. J., Park, S. W., Baik, H. S., Oh, J. H., Eom, C. Y., Kim, Y. M., Kang, B. S., Oh, J. I.: *J. Bacteriol.* 190, 6795-6804 (2008).
30. Yukl, E. T., Ioanoviciu, A., de Montellano, P. R., Moënne-Loccoz, P.: *Biochemistry.* 46, 9728-9736 (2007).
31. Sousa, E. H. S., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A.: *Protein Sci.* 16, 1708-1719 (2007).
32. Fallow, A., Domenech, P., Reed, M. B.: *J. Bacteriol.* 192, 2228-2238 (2010).
33. Martinkova, M., Kitanishi, K., Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* 288, 27702-27711 (2013).
34. El-Mashtoly, S. F., Gu, Y., Yoshimura, H., Yoshioka, S., Aono, S., Kitagawa, T.: *J. Biol. Chem.* 283, 6942-6949 (2008).
35. Yoshida, Y., Ishikawa, H., Aono, S., Mizutani, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1824, 866-872 (2012).
36. Kitanishi, K., Kobayashi, K., Uchida, T., Ishimori, K., Igarashi, J., Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* 286, 35522-35534 (2011).

37. Tuckerman, J. R., Gonzales, G., Sousa, E. H. S., Xuehua, W., Saito, J. A., Alam, M., Gilles-Gonzales M.-A.: *Biochemistry*. 48, 9764-9774 (2009).
38. Kitanishi, K., Kobayashi, K., Kawamura, Y., Ishigami, I., Ogura, T., Nakajima, K., Igarashi, J., Tanaka, A., Shimizu, T.: *Biochemistry*. 49, 10381-10393 (2010).
39. Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V., Gomelsky, M.: *J. Bacteriol.* 187, 1792-1798 (2005).
40. Nakajima, K., Kitanishi, K., Kobayashi, K., Kobayashi, N., Igarashi, J., Shimizu, T.: *J. Inorg. Biochem.* 49, 10381-10393 (2011).
41. Olson, K. R., Donald, J. A., Dombkowski, R. A., Perry, S. F.: *Resp. Physiol. Neurobi.* 184, 117-129 (2012).
42. Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., Lancaster, J. R. Jr.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 355-360 (2001).
43. Blaise, G. A., Guavin, D., Gangal, M., Authier, S.: *Toxicology*. 208, 177-192 (2005).
44. Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., Lamas, S.: *Free Radical Bio. Med.* 51, 17-29 (2011).
45. Krumenacker, J. S., Murad, F.: *Mol. Genet. Metab.* 87, 311-314 (2006).
46. Bredt, D. S.: *Free Radical Res.* 31, 577-596 (1999).
47. Takahashi, T.: *J. Gastroenterol.* 38, 421-430 (2003).
48. Dawson, V. L., Dawson, T. M.: *Prog. Brain Res.* 118, 215-229 (1998).
49. Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Green, C. J.: *Free Radical Bio. Med.* 28, 1303-1312 (2000).
50. Friebe, A., Schultz, G., Koesling, D.: *EMBO J.* 15, 6863-6868 (1996).
51. Lim, I., Gibbons, S. J., Lyford, G. L., Miller, S. M., Strege, P. R., Sarr, M. G., Chatterjee, S., Szurszewski, J. H., Shah, V. H., Farrugia G.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 288, G7-G14 (2005).
52. Peers, C., Steele, D. S.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 359-365 (2012).
53. Tan, B. H., Wong, P. T.-H., Bian, J.-S.: *Neurochem. Int.* 56, 3-10 (2010).
54. Kajimura, M., Nakanishi, T., Takenouchi, T., Morikawa, T., Hishiki, T., Yukutake, Y., Suematsu, M.: *Resp. Physiol. Neurobi.* 184, 139-148 (2012).
55. Li, Q., Lancaster, J. R. Jr.: *Nitric oxide*. 35, 21-34 (2013).
56. Huang, S., Chua, J. H., Yew, W. S., Sivaraman, J., Moore, P. K., Tan, C.-H., Deng, L.-W.: *J. Mol. Biol.* 396, 708-718 (2010).

57. Singh, S., Banerjee, R.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1814, 1518-1527 (2011).
58. Liu, C., Pan, J., Li, S., Zhao, Y., Wu, L. Y., Berkman, C. E., Whorton, A. R., Xian, M.: *Angew. Chem.* 123, 10511-10513 (2011).
59. Li, L., Rose, P., Moore, P. K.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 169-187 (2011).
60. Hughes, M. N., Centelles, M. N., Moore, K. P.: *Free Radical Bio. Med.* 47, 1346-1353 (2009).
61. Gadalla, M. M., Snyder, S. H.: *J. Neurochem.* 113, 14-26 (2010).
62. Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., Nishino, T.: *Histochem. Cell Biol.* 110, 243-250 (1998).
63. Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S., Furne, J.: *Antioxid. Redox Sign.* 15, 373-378 (2011).
64. King, S. B.: *Free Radical Bio. Med.* 55, 1-7 (2013).
65. Kabil, O., Banerjee, R.: *J. Biol. Chem.* 285, 21903-21907 (2010).
66. Cooper, C. E., Brown, G. C.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 533-539 (2008).
67. Teague, B., Asiedu, S., Moore, P. K.: *Brit. J. Pharmacol.* 137, 139 – 145 (2002).
68. Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., Wang, R.: *Science.* 322, 587-590 (2008).
69. Lefer, D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 17907-17908 (2007).
70. Kabil, O., Motl, N., Banerjee, R.: *Biochim. Biophys. Acta.* (2014) IN PRESS .
71. Stein, A., Bailey, S. M.: *Redox Biol.* 1, 32-39 (2013) .
72. Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., Snyder, S. H.: *Mol. Cell.* 45, 13-24 (2012).
73. Marciano, D., Santana, M., Nowicki, C.: *Mol. Biochem. Parasit.* 185, 114-120 (2012).
74. D'Araio, E., Shaw, N., Millward, A., Demaine, A., Whiteman, M., Hodgkinson, A.: *Acta Diabetol.* 51, 155-157 (2014).
75. Martin, G. R., McKnight, G. W., Dicay, M. S., Coffin, C. S., Ferraz, J. G. P., Wallace, J. L.: *Digest. Liver Dis.* 42, 103-109 (2010).
76. Bartz, R. R., Piantadosi, A. P.: *Crit. Care.* 14, 234-242 (2010).
77. Finkel, T.: *J. Cell Biol.* 194, 7-15 (2011).
78. Ray, P. D., Huang, B.-W., Tsuji, Y.: *Cell. Signal.* 24, 981-990 (2012).

79. Kiley, P. J., Beinert, H.: *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 181–185 (2003).
80. Takahashi, H., Sekimoto, M., Tanaka, M., Tanaka, A., Igarashi, J., Shimizu, T.: *J. Inorg. Biochem.* 109, 66-71 (2012).
81. Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M.: *J. Bacteriol.* 187, 4774-4781 (2005).
82. Tanaka, A., Takahashi, H., Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* 282, 21301-21307 (2007).
83. Nicolau, Y. F., Menard, J. C.: *J. Cryst. Growth.* 92, 128-142 (1988).
84. Du, Y., Liu, G., Yan, Y., Huang, D., Luo, W., Martinkova, M., Man, P., Shimizu, T.: *Biometals.* 26, 839-852 (2013).
85. <http://www.wako-chem.co.jp/english/labchem/product/life/Phos-tag/> 24.3.2014.
86. <http://www.uniprot.org/uniprot/A7HD43> 29.4.2014.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení S adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|-------------------------------|----------|-----------------|----------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |